



Instituto Cajal  
Departamento de Biología Molecular  
Facultad de Ciencias  
Universidad Autónoma de Madrid



# MODULACIÓN DE LA ELONGACIÓN AXONAL Y LA EXCITABILIDAD NEURONAL POR RECEPTORES PURINÉRGICOS P2Y1, P2Y13 Y P2X7

TESIS DOCTORAL

Ana M. del Puerto del Pino  
2013

Trabajo dirigido por el Dr. Juan José Garrido Jurado.





Instituto Cajal  
Departamento de Biología Molecular  
Facultad de Ciencias  
Universidad Autónoma de Madrid



Memoria de Investigación presentada por

**Ana M. del Puerto del Pino**

Para optar al grado de

Doctor en Biología Molecular por la Universidad Autónoma de Madrid.

Trabajo dirigido por el Dr. Juan José Garrido Jurado (Instituto Cajal-CSIC)

Vº.Bº del director de Tesis,

Juan José Garrido Jurado

La doctoranda,

Ana M. del Puerto del Pino

Este trabajo ha sido realizado en el laboratorio del Doctor Juan José Garrido Jurado en el Instituto Cajal (CSIC) y en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM). Desde febrero del 2009 hasta septiembre del 2009 ha sido financiado por un contrato de la red CIBERNED (ISCIII). Desde octubre del 2009 hasta la actualidad con una beca/contrato FPI de la UAM.









## ***Índice***

---



<b>ABSTRACT .....</b>	<b>15</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>19</b>
1. DESARROLLO DE LA POLARIDAD MORFOLÓGICA Y FUNCIONAL DE LAS NEURONAS.....	21
1.1 Las neuronas de hipocampo en cultivo como modelo de estudio de la polaridad neuronal .....	21
1.2 Adquisición de polaridad neuronal y especificación axonal.....	22
1.3 Elongación y navegación axonal: El cono de crecimiento y modificaciones del citoesqueleto .....	22
2 VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN LA ESPECIFICACIÓN Y CRECIMIENTO AXONAL.....	23
2.1 Señales extracelulares y polaridad neuronal .....	23
2.2 Vías de señalización intracelulares y polaridad neuronal.....	24
2.2.1 Vías de señalización dependientes de la actividad de PI3K y polaridad neuronal.....	24
2.2.2 Segundos mensajeros celulares y polaridad neuronal .....	26
3 MANTENIMIENTO DE LA POLARIDAD NEURONAL Y EL SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN .....	27
4 NUCLEÓTIDOS Y RECEPTORES PURINÉRGICOS EN EL SISTEMA NERVIOSO.....	29
4.1 Almacenamiento, liberación e hidrólisis extracelular de los nucleótidos .....	30
4.2 Receptores purinérgicos .....	31
4.2.1. Receptores purinérgicos P2X.....	31
4.2.2 Receptores purinérgicos P2Y.....	32
4.3 Función de los receptores purinérgicos P2 en el sistema nervioso .....	33
4.3.1 Receptores purinérgicos, neurotransmisión y neuromodulación en el sistema nervioso central.....	33
4.3.2 Desarrollo y plasticidad del sistema nervioso central.....	34
4.3.3 Señalización purinérgica en las redes de comunicación neurona-glía .....	36
4.4 Implicación de los receptores purinérgicos en neurodegeneración y neuroprotección .....	37
5 EL RECEPTOR P2X7 .....	38
5.1 Estructura molecular y señalización intracelular. ....	39
5.2 Regulación farmacológica .....	40
5.3 Localización en el sistema nervioso .....	40
6 Los receptores P2Y1 y P2Y13 .....	40
6.1 Estructura molecular y señalización intracelular .....	40
6.2 Regulación farmacológica .....	41
6.3 Localización en el sistema nervioso .....	41
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>43</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>47</b>
1 CULTIVOS CELULARES.....	49
1.1 Cultivo primario de neuronas de hipocampo .....	49
1.2 Cocultivo de astrocitos .....	50
1.3 Cultivo de células HEK293T y transfección.....	50
1.4 Cultivo organotípico de cerebro de rata .....	50
2 TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS .....	51
3 PLÁSMIDOS .....	52
4 ELECTROPORACIÓN (NUCLEOFECIÓN) DE NEURONAS DE HIPOCAMPO.....	52
5 INTRODUCCIÓN DE PLÁSMIDOS DE EXPRESIÓN MEDIANTE <i>GENE GUN</i> .....	53
6 INMUNOCITOQUÍMICA Y CUANTIFICACIÓN.....	53
7 INDUCCIÓN DE ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL TRANSITORIA .....	54
8 INMUNOHISTOQUÍMICA.....	55
9 ANALISIS DE PROTEINAS POR	

	ELECTROTRANSFERENCIA E INMUNODETECCIÓN ( <i>WESTERN BLOT</i> ).....	55
10	REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS .....	56
11	ESTUDIOS DE CALCIO INTRACELULAR, ANÁLISIS MICROFLUORIMÉTRICO .....	56
12	ESTUDIOS DE AMPc, ANÁLISIS DE FRET.....	57

## RESULTADOS ..... 59

1	PAPEL DE LOS NUCLEÓTIDOS DE ADENINA, ADP Y ATP EN LA AXONOGÉNESIS Y ELONGACIÓN AXONAL .....	61
2	ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DE LOS RECEPTORES P2X EN LA ELONGACIÓN AXONAL. PAPEL DEL RECEPTOR P2X7 .....	62
2.1	La inhibición farmacológica del receptor P2X7 promueve el crecimiento axonal en neuronas de hipocampo en cultivo .....	62
2.2	Modificaciones en la expresión del receptor P2X7 inducen variaciones en la elongación axonal en neuronas de hipocampo en cultivo .....	63
2.3	El receptor P2X7 es el responsable de la entrada de $Ca^{+2}$ en la zona más distal del axón.....	64
2.4	El receptor purinérgico P2X7 se localiza en la zona más distal del axón en neuronas de hipocampo en cultivo .....	66
3	ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DE LOS RECEPTORES P2Y EN LA ELONGACIÓN AXONAL. PAPEL DE LOS RECEPTORES P2Y1 Y P2Y13 .....	67
3.1	Los receptores purinérgicos P2Y1 y P2Y13 se localizan en la zona más distal del axón en neuronas de hipocampo en cultivo.....	67
3.2	La inhibición farmacológica de los receptores P2Y1 y P2Y13 promueve efectos antagónicos durante el proceso de elongación axonal en neuronas de hipocampo en cultivo .....	68
3.3	Modificaciones en la expresión de los receptores P2Y1 y P2Y13 inducen variaciones en la elongación axonal de neuronas de hipocampo en cultivo .....	69
4	REGULACIÓN COORDINADA DE LOS RECEPTORES PURINÉRGICOS DURANTE LA ELONGACIÓN AXONAL.....	71
4.1	La inhibición o supresión del receptor P2Y13 no promueve el crecimiento axonal en ausencia de la actividad del receptor P2Y1 en neuronas de hipocampo en cultivo.....	71
4.2	La modulación de la elongación axonal mediada por ADP es dependiente de la actividad del receptor P2X7 .....	72
4.3	La modificación de la actividad de los receptores P2Y1, P2Y13 y P2X7 de forma independiente, no modifica los niveles de expresión de los mismo en neuronas de hipocampo en cultivo .....	74
5	ESTUDIO DE UN MECANISMO DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR COMÚN MEDIADO POR LOS RECEPTORES P2Y1, P2Y13 Y P2X7 PARA MODULAR EL PROCESO DE ELONGACIÓN AXONAL EN NEURONAS DE HIPOCAMPO EN CULTIVO.....	75
5.1	Comprobación de la vía de señalización descrita para los receptores P2Y1 y P2Y13 en nuestro modelo de neuronas de hipocampo en cultivo.....	75
5.2	La actividad de adenilato ciclasas (ACs) es necesaria para promover el crecimiento axonal dependiente de ADP en neuronas de hipocampo en cultivo .....	77
5.3	Adenilato ciclasa 5 coordina el proceso de elongación axonal mediado por los receptores P2Y1, P2Y13 y P2X7 en neuronas de hipocampo en cultivo .....	80
5.4	La acción coordinada de P2Y1, P2Y13 y P2X7 regula el crecimiento axonal a través de la modulación de la vía de PI3K/AKT/GSK3. ....	85
6	IMPLICACIÓN DEL RECEPTOR P2X7 EN EL MANTENIMIENTO Y PLASTICIDAD DEL SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN (SIA) EN CONDICIONES PATOLÓGICAS.....	87
6.1	La activación del receptor P2X7 disminuye la expresión	

de ankirina G y canales de Na <sup>+</sup> dependientes de voltaje en el SIA .....	87
6.2 La modulación de la expresión de las proteínas del SIA por el receptor P2X7 es dependiente de calcio.....	91
6.3 La degradación de ankirina G y canales de Na <sup>+</sup> en el SIA está mediada por calpaína .....	93
6.4 El receptor P2X7 modula la corriente de sodio dependiente de voltaje y la excitabilidad neuronal en neuronas hipocampales.....	95
6.5 El antagonista del receptor P2X7, BBG reduce el daño en el SIA tras un proceso de isquemia cerebral.....	97

## DISCUSIÓN..... 101

1 LOS NUCLEÓTIDOS DE ADENINA, UNA SEÑAL EXTRACELULAR QUE REGULA EL PROCESO DE ELONGACIÓN AXONAL .....	103
1.1 El ATP y el receptor P2X7 como reguladores negativos del crecimiento axonal.....	103
1.2 Función del ADP como modulador positivo del crecimiento axonal mediado por receptores P2Y.....	105
1.3 Relación entre ATP y ADP y los receptores P2Y1, P2Y13 y P2X7 durante el proceso de elongación axonal .....	106
2 AMPc Y ADENILATO CICLASA 5 COMO PUNTO COMÚN EN LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE P2Y1, P2Y13 Y P2X7 DURANTE EL PROCESO DE ELONGACIÓN AXONAL .....	107
2.1 Los receptores purinérgicos y el AMPc durante el proceso de elongación axonal .....	107
2.2 Papel de la adenilato ciclasa 5 (AC5) en la coordinación de la señalización purinérgica en el proceso de elongación axonal .....	108
2.3 Receptores purinérgicos y la vía de PI3K/AKT/GSK3 como reguladores de la elongación axonal .....	109
3 FUNCIÓN DEL RECEPTOR P2X7 EN EL MANTENIMIENTO DE LA INTEGRIDAD DEL SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN Y LA REGULACIÓN DE LA EXCITABILIDAD NEURONAL.....	111
3.1 El receptor P2X7 como regulador del SIA y la excitabilidad neuronal.....	111
3.2 Papel del receptor P2X7 en el mantenimiento del SIA tras el proceso de isquemia cerebral .....	113

## CONCLUSIONES..... 115

## BIBLIOGRAFÍA..... 119

## ABREVIATURAS..... 141

# ÍNDICE DE FIGURAS

## INTRODUCCIÓN

Figura	I1. Diferentes estadios del desarrollo de neuronas de hipocampo.....	21
Figura	I2. Vías de señalización intracelulares y polaridad neuronal .....	25
Figura	I3. Estructura y composición del SIA .....	28
Figura	I4. Desensamblaje del SIA tras un daño en el sistema nervioso central .....	29
Figura	I5. Vías principales asociadas al metabolismo de los nucleótidos extracelulares.....	31
Figura	I6. Agonistas de los receptores P2Y y mecanismos de señalización conocidos .....	33
Figura	I7. Resumen de los mecanismos de regulación neurona-glía .....	36
Figura	I8. Estructura molecular del receptor P2X7 .....	39
Tabla	I1 Almacenamiento y co-liberación del ATP junto con otros neurotransmisores en el sistema nervioso central.....	30
Tabla	I2. Efectos neuromoduladores de la transmisión sináptica mediados por receptores purinérgicos en el sistema nervioso .....	34

## OBJETIVOS

Figura	O1. El ATP produce un incremento de $Ca^{+2}$ en la zona más distal del axón en neuronas hipocampales. ....	45
--------	--	----

## MATERIALES Y MÉTODOS

Figura	M1. Esquema del proceso de elaboración de un cocultivo primario de neuronas de hipocampo sobre astrocitos.....	49
Tabla	M1. Tratamientos farmacológicos .....	51
Tabla	M2. Plásmidos .....	52
Tabla	M3. Anticuerpos primarios.....	54

## RESULTADOS

Figura	R1. Los nucleótidos de adenina, ATP y ADP modulan el crecimiento axonal de forma antagónica en neuronas de hipocampo.....	61
Figura	R2. La inhibición del receptor P2X7 induce un aumento de la longitud axonal en neuronas de hipocampo en cultivo.....	63
Figura	R3. El vector de interferencia del receptor P2X7 induce un incremento de la longitud axonal, mientras que su sobre-expresión regula de forma negativa el crecimiento axonal en neuronas hipocampales .....	64
Figura	R4. El tratamiento con BBG bloquea la reducción de longitud axonal y la entrada de calcio en la zona más distal del axón promovida por el tratamiento con ATP .....	65
Figura	R5. Localización del receptor P2X7 en neuronas de hipocampo en cultivo .....	66
Figura	R6. Localización de los receptores P2Y1 y P2Y13 en neuronas de hipocampo en cultivo .....	67
Figura	R7. Efectos de la inhibición de los receptores P2Y1 y P2Y13 en la elongación axonal en neuronas hipocampales.....	68
Figura	R8. Efectos de los plásmidos de expresión y de interferencia de los receptores P2Y1 y P2Y13 en neuronas hipocampales.....	70
Figura	R9. El efecto de inhibición o supresión del receptor P2Y1 enmascara el efecto de inhibición o supresión del receptor P2Y13 durante la elongación axonal en neuronas hipocampales.....	72
Figura	R10. La regulación de la elongación axonal mediada por ADP es dependiente de la actividad del receptor P2X7 (I) .....	73
Figura	R11. La regulación de la elongación axonal mediada por ADP es dependiente de la actividad del receptor P2X7 (II).....	74
Figura	R12. Los tratamientos con agonistas y antagonistas de los	



receptores P2Y1, P2Y13 y P2X7 no modifican sus niveles de expresión.....	75
Figura R13. Los receptores P2Y1 y P2Y13 regulan el proceso de elongación axonal a través de la activación de proteínas $G_q$ y $G_i$ , respectivamente en neuronas hipocampales.....	76
Figura R14. La inhibición de PLC y PKC inhibe el efecto de crecimiento axonal mediado por el ADP y la inhibición del receptor P2Y13 .....	76
Figura R15. El receptor P2Y1 induce un aumento de crecimiento axonal a través de adenilato ciclasa, mientras que el receptor P2Y13 la inhibe para regular negativamente el crecimiento axonal .....	78
Figura R16. El receptor P2Y1 induce un aumento de crecimiento axonal a través del aumento de AMPc y PKA, mientras que el receptor P2Y13 regula negativamente este vía de señalización .....	79
Figura R17. AC5 aumenta su expresión a lo largo del axón en neuronas hipocampales .....	80
Figura R18. La inhibición de NKY80 bloquea los efectos producidos por los receptores purinérgicos P2Y1, P2Y13 y P2X7.....	82
Figura R19. La supresión de AC5 bloquea los efectos producidos por los receptores purinérgicos P2Y1, P2Y13 y P2X7.....	83
Figura R20. La inhibición de AC5 bloquea el incremento de AMPc observado en el cono de crecimiento axonal tras un tratamiento con ADP o BBG .....	84
Figura R21. Los efectos producidos en la elongación axonal por los receptores P2Y1, P2Y13 y P2X7 están mediados por la vía de PI3K/AKT/GSK3 $\alpha\beta$ .....	85
Figura R22. Los receptores P2Y1 y P2Y13 modifican el estado de fosforilación de AKT y GSK3 en neuronas de hipocampo en cultivo.....	86
Figura R23. El incremento de ATP produce una reducción de ankirina G y canales de sodio en el SIA.....	88
Figura R24. La inhibición del receptor P2X7 impide la reducción de la concentración de ankirina G y canales de sodio en el SIA.....	88
Figura R25. La expresión exógena del receptor P2X7 reduce la concentración de ankirina G y canales de sodio en el SIA .....	89
Figura R26. la inhibición del receptor P2X7 recupera y aumenta la expresión de ankirina G y canales de sodio en el SIA en neuronas que sobre-expresan el receptor P2X7 .....	90
Figura R27. La supresión del receptor P2X7 bloquea la reducción en la concentración de ankirina G y canales de sodio en el SIA de neuronas de hipocampo en cultivo .....	90
Figura R28. Los efectos en la regulación del SIA son dependientes de la entrada de $Ca^{+2}$ a través del receptor P2X7.....	91
Figura R29. La supresión del receptor P2X7 bloquea la reducción en la concentración de ankirina G y canales de sodio en el SIA mediada por $CaCl_2$ en neuronas de hipocampo en cultivo .....	92
Figura R30. La reducción de $CaCl_2$ extracelular con EGTA bloquea la disminución de concentración de ankirina G y canal de sodio mediada por la activación del receptor P2X7.....	92
Figura R31. El tratamiento con EGTA recupera y aumenta la expresión de ankirina G y canales de sodio en el SIA en neuronas que sobre-expresan el receptor P2X7 .....	93
Figura R32. El receptor P2X7 induce la degradación de proteínas del SIA de una forma calpaína-dependiente .....	94
Figura R33. El tratamiento con inhibidores de calpaína recupera y aumenta la expresión de ankirina G y canales de sodio en el SIA en neuronas que sobre-expresan el receptor P2X7 .....	95
Figura R34. La inhibición del receptor P2X7 con BBG aumenta la amplitud de la corriente de sodio y la excitabilidad neuronal en rodajas de cerebro en cultivo.....	95
Figura R35. La expresión exógena del receptor P2X7 reduce la amplitud de la corriente de sodio y la excitabilidad neuronal en rodajas de cerebro en cultivo.....	96
Figura R36. La inhibición del receptor P2X7 durante 3h tras un tratamiento con ATP recupera la concentración de ankirina G y canal de sodio en el SIA .....	97

Figura R37. La inhibición del receptor P2X7 recupera parcialmente la concentración de ankirina G y $\beta$ IV-espectrina en el SIA de ratas sometidas a un proceso de isquemia cerebral .....	98
---	----

## DISCUSIÓN

Figura D1. Modelo que describe la localización de los receptores P2Y1, P2Y13 y P2X7 en neuronas hipocampales y las vías de señalización que coordinan en el cono de crecimiento para modular el proceso de elongación axonal .....	110
Figura D2. Modelo que describe los mecanismos intracelulares que regulan la pérdida de concentración de proteínas del SIA descrita para el receptor P2X7 en este estudio .....	112

## ***Abstract***

---



## ABSTRACT

During the establishment of neural circuits, the axons grow guided by positive and negative stimuli to establish synapses with their target cells. These stimuli generated by different extracellular factors, coordinate the reorganization of the microtubule and actin cytoskeleton in the axonal growth cone through specific signaling pathways, modulating the rate and the directionality of growth. However, the functionality of neural circuits depends not only on proper connectivity, but also on the regulation of action potentials that allow the transmission of information. In this sense, the axon initial segment (AIS) is responsible for the generation and modulation of action potentials and the maintenance of neuronal polarity.

In recent years, extracellular adenine nucleotides are being studied both in physiological processes during brain development and during synaptic transmission, as well as in pathophysiological processes. However, we don't know their involvement in the regulation of axonal elongation process and its role in regulating neuronal excitability in physiological or pathological conditions.

In this study, we first analyzed the contribution of adenine nucleotides, ATP and ADP, in the process of axonal elongation in hippocampal neurons. Our results show that ADP promotes axon growth through P2Y1 receptor, whereas P2Y13 receptor is a negative regulator. However, an increase in the concentration of extracellular ATP blocks axonal growth acting through the P2X7 receptor. Signaling through each of these receptors is regulated in a coordinated manner by adenylate cyclase 5 (AC5), which regulates cAMP concentration as well as PI3K-AKT-GSK3 $\alpha/\beta$  signaling pathway, which ultimately controls axonal elongation process. Furthermore, in later stages of development and in pathological processes of cerebral ischemia, the increase in P2X7 receptor activity due to high concentrations of extracellular ATP, induces axon initial segment protein degradation. Among these proteins are voltage-dependent sodium channels that are responsible of action potentials generation promoting a loss of neuronal excitability. These effects are caused by calcium entry mediated by P2X7 and calpain activation. Our results show that inhibition of the P2X7 receptor with Brilliant Blue G (BBG) prevents this degradation and protect axon initial segment after a cerebral ischemic process.

These results show the importance of the purinergic system in the physiology and pathology associated with the nervous system, and open new ways of study in the regulation of axon initial segment and axon regeneration.

## RESUMEN

Durante el establecimiento de los circuitos neuronales, los axones crecen guiados por estímulos positivos y negativos hasta establecer sinapsis con sus células diana. Estos estímulos generados por diferentes factores extracelulares en el cono de crecimiento axonal inducen la reorganización del citoesqueleto de actina y microtúbulos, a través de cascadas de señalización específicas, modulando la velocidad y la direccionalidad del crecimiento. Sin embargo, la funcionalidad de los circuitos neuronales no sólo depende de una correcta conectividad sino que es necesaria la regulación de los potenciales de acción necesarios para la transmisión vectorial de la información. En este sentido, el segmento inicial del axón (SIA) es responsable de la generación y modulación de potenciales de acción y del mantenimiento de la polaridad neuronal.

En los últimos años, los nucleótidos extracelulares de adenina están siendo objeto de estudio tanto en procesos fisiológicos durante el desarrollo del cerebro, como en su función en la transmisión sináptica, así como en procesos patofisiológicos. Sin embargo, no conocemos su implicación en la regulación del proceso de elongación axonal así como su papel en la regulación del inicio de la excitabilidad neuronal en condiciones fisiológicas o patológicas.

En este estudio, en primer lugar analizamos la contribución de los nucleótidos de adenina, ATP y ADP, en el proceso de elongación axonal en neuronas hipocampales. Nuestros resultados muestran que el ADP promueve crecimiento axonal a través del receptor P2Y1, mientras que el receptor P2Y13 es un regulador negativo. Sin embargo, un incremento en la concentración de ATP extracelular bloquea el crecimiento axonal actuando a través del receptor P2X7. La señalización mediada por estos receptores está regulada de forma coordinada por adenilato ciclasa 5 (AC5), que regula la concentración de AMPc y la vía de señalización de PI3K-AKT-GSK3 $\alpha/\beta$ , la cual controla finalmente el proceso de elongación axonal. Por otro lado, en etapas posteriores de desarrollo y en procesos patológicos de isquemia cerebral, el incremento de actividad del receptor P2X7, debido a concentraciones elevadas de ATP extracelular, induce la degradación de las proteínas del SIA. Entre estas proteínas se encuentran los canales de sodio dependientes de voltaje que generan los potenciales de acción y ello conlleva una pérdida de excitabilidad neuronal. Estos efectos están causados por la entrada de calcio mediada por P2X7 y la activación de calpaína. Nuestros resultados muestran que la inhibición del receptor P2X7 con Brilliant Blue G (BBG) impide esta degradación y protege el segmento inicial del axón tras un proceso de isquemia cerebral.

Estos resultados muestran la importancia del sistema purinérgico en la fisiología y patología asociadas al sistema nervioso, y abren nuevas vías de estudio en la regulación del segmento inicial del axón y la regeneración axonal.

## ***Introducción***

---





## 1. DESARROLLO DE LA POLARIDAD MORFOLOGICA Y FUNCIONAL DE LAS NEURONAS.

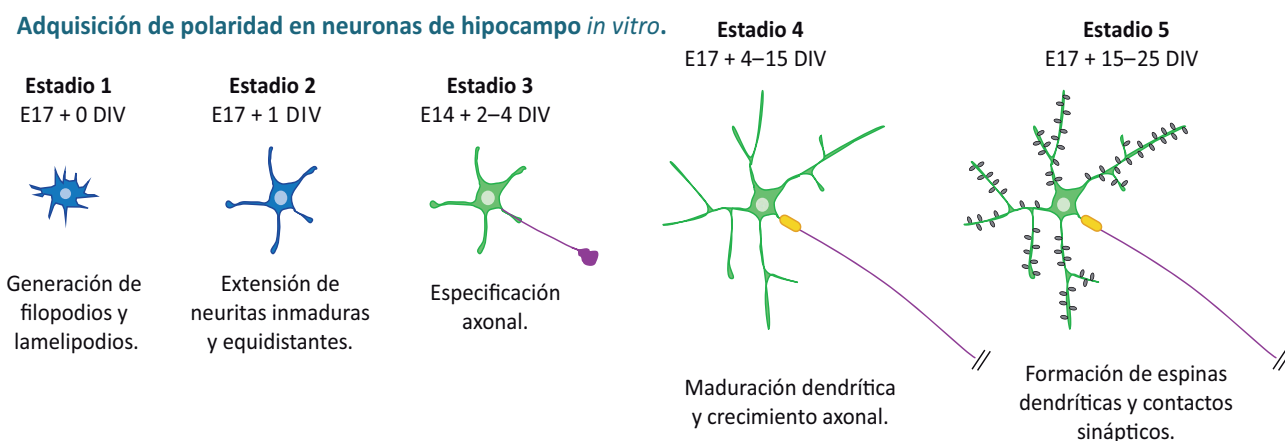
Las funciones del sistema nervioso central están basadas en el establecimiento de conexiones neuronales adecuadas. La formación de estas redes neuronales comprende una serie de eventos sucesivos, entre los que destacan la neurogénesis, la migración neuronal, el establecimiento de polaridad neuronal, los mecanismos de navegación axonal, la maduración dendrítica y la sinaptogénesis. En esta tesis nos hemos centrado en el estudio de mecanismos que regulan la elongación axonal y la modulación de la función del segmento inicial del axón.

La polaridad celular, supone la ruptura de la simetría de la célula y es esencial en diferentes procesos biológicos, incluyendo la morfogénesis epitelial, la migración celular y la quimiotaxis. La polarización neuronal fue descrita por primera vez por Santiago Ramón y Cajal en 1891, en su *Ley de Polarización Dinámica* (Ramón y Cajal, 1891; Ramón y Cajal, 1897), en la cual se establece que cada neurona posee estructuras receptoras y emisoras que permiten la transmisión vectorial de la información entre ellas. Hoy en día, está bien establecido que las neuronas son células altamente polarizadas morfológica y funcionalmente. Están compartimentalizadas en dos dominios, somatodendrítico y axonal, que contienen todas las estructuras morfológicas necesarias para desarrollar funciones específicas. La información nerviosa se propaga de unas neuronas a otras de una forma direccional, las dendritas reciben el impulso sináptico proveniente de otras neuronas, y el axón integra y propaga dicha información a otras neuronas, permitiendo así, el flujo direccional de la información en el sistema nervioso y la formación de redes neuronales (Kandel, 2000).

En los últimos años, la pregunta clave en torno a la polaridad neuronal ha sido la siguiente, ¿cómo se generan y se mantienen los compartimentos somatodendrítico y axonal? Los diferentes estudios se han centrado en el análisis de la organización asimétrica de estructuras celulares, las cascadas de señalización intracelulares, las señales aminoacídicas que condicionan la localización de proteínas, los mecanismos de transporte y las modificaciones en la dinámica del citoesqueleto, en los cuales nos centraremos en apartados posteriores.

### 1.1. LAS NEURONAS DE HIPOCAMPO EN CULTIVO COMO MODELO DE ESTUDIO DE LA POLARIDAD NEURONAL.

El establecimiento de la polaridad neuronal se estudia *in vitro* con un modelo de cultivo primario de neuronas de hipocampo, disociadas a partir de embriones de rata o ratón. Este modelo, nos permite estudiar los diferentes aspectos del desarrollo neuronal *in vivo* incluyendo polarización, maduración y sinaptogénesis



**Figura 11.** Diferentes estadios del desarrollo de neuronas de hipocampo. Imagen adaptada de Barnes and Polleux, 2009.

(Dotti et al., 1988). El modelo de cultivo de neuronas de hipocampo fue desarrollado en el laboratorio de G. Banker, es un modelo reproducible y bien caracterizado, en el que se han descrito los cambios morfológicos que ocurren durante la adquisición de polaridad, permitiendo establecer cinco estadios de diferenciación neuronal (**Fig. 11**): en primer lugar, tras su adhesión al sustrato, las neuronas hipocampales generan lamelipodios a partir de un soma redondeado (estadio 1). Tras varias horas, las neuronas forman neuritas inmaduras morfológicamente iguales y equidistantes que presentan movimientos de elongación-retracción constantes (estadio 2). Pasadas 36h en cultivo, una de las neuritas iniciales crece más rápidamente que el resto, rompiendo la simetría celular y generando una nueva estructura, el axón (estadio 3). La formación del axón es esencial para la adquisición de la polaridad morfológica y funcional. El resto de neuritas mantienen su longitud hasta los 4 días de desarrollo in vitro, en el estadio 4, cuando comienza la elongación y maduración dendrítica. En este estadio también se observa una nueva estructura, el segmento inicial del axón (SIA), lugar de generación de los potenciales de acción y esencial para el mantenimiento de la polaridad morfológica y funcional. La continuación de la maduración dendrítica y axonal, estadio 5, permite la generación de espinas dendríticas prematuras, y se empiezan a observar los primeros contactos sinápticos que permiten la transmisión del impulso eléctrico (Dotti et al., 1988).

## 1.2. ADQUISICIÓN DE POLARIDAD NEURONAL Y ESPECIFICACIÓN AXONAL.

El primer paso durante la adquisición de polaridad neuronal es la especificación axonal. En los pasos previos a la polarización neuronal (estadio 2) las neuritas reciben señales positivas y negativas, tanto extracelulares como intracelulares, que permiten un balance de crecimiento equilibrado entre las mismas. Cuando este equilibrio se rompe en una neurita determinada, un balance positivo de señales genera un sistema de auto-activación continuo, elongando con mayor velocidad para generar el axón (estadio 3). Este bucle de retroalimentación positiva, a su vez genera señales negativas que evitan que el resto de neuritas crezcan para formar otro axón (Andersen and Bi, 2000).

Asimismo, durante el estadio 2, previo a la formación del axón, se ha observado que en una de las neuritas, el cono de crecimiento aumenta su tamaño y que presenta mayor transporte de organelas (ribosomas, vesículas, mitocondrias, peroxisomas y vesículas del trans-Golgi), así como de proteínas de membrana (Bradke and Dotti, 1997) necesarias para el crecimiento del futuro axón. Sin embargo, se ha descrito como alternativa, que algunas proteínas relacionadas con la especificación axonal, no llegan al cono de crecimiento por mecanismos de transporte, sino que se localizan específicamente en el axón por degradación selectiva de las mismas en el resto de neuritas durante el desarrollo axonal (Schwamborn et al., 2007a; Schwamborn et al., 2007b; Yan et al., 2006).

Todas estas señales positivas y negativas y las modificaciones en el componente intracelular, generan un aumento en la cantidad de membrana plasmática y permiten la localización de proteínas señalizadoras y receptores de membrana específicos en el cono de crecimiento axonal. En consecuencia, se genera una red de señalización celular localizada, que regula la especificación y el crecimiento axonal a través de la modificación de la dinámica del citoesqueleto de microtúbulos y microfilamentos de actina en el cono de crecimiento axonal (Fukata et al., 2002; Neukirchen and Bradke, 2011).

## 1.3. ELONGACIÓN Y NAVEGACIÓN AXONAL: EL CONO DE CRECIMIENTO Y MODIFICACIONES DEL CITOESQUELETO.

El cono de crecimiento comprende la zona terminal de los procesos neuríticos y se puede dividir en dos

compartimentos: la región P o periférica, rica en lamelipodios y filopodios, y la región C o central, localizada detrás de la región P, formada por una red densa de microtúbulos y rica en organelas celulares como mitocondrias y vesículas exocitóticas. A pesar de que la mayoría de microtúbulos terminan en la zona C, alguno penetra en la región P produciéndose interacciones con la actina y los componentes de la señalización celular, necesarias para la motilidad del cono de crecimiento (Schaefer et al., 2002). Finalmente, existe una tercera región, localizada entre la P y C, denominada región T o de transición, rica en estructuras contráctiles como la acto-miosina que regula las interacciones actina-microtúbulos (Lowery and Van Vactor, 2009).

En el cono de crecimiento axonal, el citoesqueleto de actina es más dinámico y menos denso, a diferencia del resto de neuritas. Esto es regulado por RhoGTPasas, como Rac1, cdc42 y RhoA, que regulan diferentes proteínas de unión a actina, como profilina IIa, controlando la polimerización y despolimerización de los microfilamentos de actina (Da Silva et al., 2003). La desestabilización controlada de microfilamentos de actina permite el avance de los microtúbulos, que presentan una mayor estabilidad a lo largo del axón que en las neuritas inmaduras, estimulando el crecimiento axonal (Baas, 2002; Bradke and Dotti, 1999; Witte et al., 2008). Los microtúbulos se caracterizan por tener “inestabilidad dinámica” en sus extremos de crecimiento, que les permite remodelar rápidamente su organización, y por tanto la velocidad y dirección de crecimiento en respuesta a señales extracelulares (Howard and Hyman, 2003). Además sirven como soporte para el transporte de organelas celulares y diferentes proteínas al cono de crecimiento axonal, esencial para la función neuronal (Hirokawa et al., 2010). Por todo ello, la dinámica de microtúbulos es esencial en la especificación y en la navegación axonal.

El cono de crecimiento axonal migra a lo largo de rutas específicas en respuesta a gradientes de señales extracelulares secretadas para formar redes neuronales precisas. Por ello, durante la navegación axonal, el cono de crecimiento cambia su dirección, de una forma bidireccional controlada por la dinámica de los microfilamentos de actina (Chao et al., 2009; O'Donnell et al., 2009; Tessier-Lavigne and Goodman, 1996). Estos cambios se producen debido a variaciones en la concentración de segundos mensajeros celulares, como el  $\text{Ca}^{+2}$  y AMPc/GMPc de forma polarizada, en función de la localización y concentración de señales extracelulares quimioatrayentes o repulsivas. Una señal quimioatrayente induce un aumento de AMPc y una disminución de GMPc, lo que supone una liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  de retículo endoplásmico, mientras que en el caso de una señal de repulsión ocurre lo contrario (Gomez and Zheng, 2006; Henley and Poo, 2004; Tojima et al., 2011). Estas modificaciones intracelulares en el cono de crecimiento, se traducen en modificaciones locales en la dinámica del citoesqueleto y mecanismos de adhesión (Dent et al., 2011; Lowery and Van Vactor, 2009; Myers et al., 2011). Además se generan cambios en el sistema de tráfico de membrana, que permiten movimientos de atracción o repulsión (Itoufusa and Kamiguchi, 2011; Tojima et al., 2011; Zylbersztejn and Galli, 2011).

## 2. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN LA ESPECIFICACIÓN Y CRECIMIENTO AXONAL.

### 2.1. SEÑALES EXTRACELULARES Y POLARIDAD NEURONAL.

Las neuronas en cultivo tienen una capacidad intrínseca para polarizar su estructura. Para que se produzca la formación de un axón y varias dendritas, son necesarias un conjunto de vías señalización intracelular que se activan en respuesta a señales extracelulares.

Entre los factores extracelulares responsables del crecimiento neuronal cabe destacar la familia de **factores**

**neurotróficos.** Entre ellos el NGF (*Nerve Growth Factor*), el BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*), el NT-3 (*Neurotrophin-3*) o el IGF-I han sido descritos como aceleradores de la polarización neuronal promoviendo el crecimiento axonal, todo ello como resultado de la activación de los receptores tirosina quinasa (Trks o IGF-IR) que regulan la actividad de PI3K (*Phosphatidylinositol 3-kinase*) (Huang and Reichardt, 2003). Más concretamente, el BDNF, promueve la especificación axonal induciendo la fosforilación de LKB1 de una forma PKA-dependiente (Shelly et al., 2007) y el receptor de IGF-I es necesario para especificar y crecer un axón, modulando la vía de señalización de PI3K-cdc42 (Sosa et al., 2006).

Otras proteínas secretadas como las **netrinas** y **WNT** promueven el crecimiento axonal y la migración. Proteínas de la familia de WNT pueden modificar la trayectoria de axón y dendritas afectando a la polaridad neuronal, gracias a la activación de receptores *Frizzled* en *C. elegans* (Hilliard and Bargmann, 2006; Serafini et al., 1994); mientras que las netrinas están implicadas en la guía axonal durante el desarrollo, como ejemplo, el ratón deficiente en netrina-1 presenta defectos en las proyecciones axonales en la medula espinal (Serafini et al., 1994).

Las **moléculas de la matriz extracelular**, como la laminina o **moléculas de adhesión** como NgCAM inducen la especificación y la elongación axonal. La aplicación local de ambas moléculas dirige la especificación axonal en neuronas de hipocampo en cultivo (Esch et al., 1999; Menager et al., 2004). Incluso, se ha descrito que el tratamiento con laminina produce un incremento de PIP<sub>3</sub> (el producto lipídico de la actividad de PI3K) en el cono de crecimiento axonal, estimulando la elongación axonal (Menager et al., 2004).

Además de señales positivas, como las que hasta ahora hemos descrito, existen **señales negativas** que regulan el crecimiento axonal, como la Semaforina3A, que tiene una función dual durante la especificación de la capas corticales, funciona como quimiorrepelente de las proyecciones axonales y como quimioatractivo de las dendritas hacia la pia, modulando el receptor de neuropilina-1 y la concentración de GMPc (Bagnard et al., 1998; Polleux et al., 1998; Shelly et al., 2011). Del mismo modo, se ha observado que el tratamiento con Semaforina3A inhibe la formación del axón y promueve el desarrollo dendrítico, en neuronas de hipocampo en cultivo, favoreciendo el aumento de la concentración de GMPc y la reducción de AMPc (Shelly et al., 2011). Otra señal extracelular que regula de forma negativa el crecimiento axonal es el Ca<sup>+2</sup>, el bloqueo de las corrientes de Ca<sup>+2</sup> con un quelante acelera el crecimiento axonal, mientras que la fotoliberación de Ca<sup>+2</sup> reduce dicho crecimiento durante del desarrollo de la medula espinal (Gomez and Spitzer, 1999).

## 2.2. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULARES Y POLARIDAD NEURONAL.

### 2.2.1. Vías de señalización dependientes de la actividad de PI3K y polaridad neuronal.

Los diferentes factores extracelulares actúan sobre receptores específicos para activar o inhibir diferentes vías de señalización intracelulares (Arimura and Kaibuchi, 2007). Las diferentes vías de señalización reguladas por **PI3K** son las más estudiadas durante el proceso de adquisición de la polaridad neuronal (**Fig. 12**). La activación local de PI3K por la presencia de factores de crecimiento extracelulares, produce la acumulación de fosfatidilinositol 3,4,5-trifostato (PIP<sub>3</sub>) en el cono de crecimiento de una de las neuritas inmaduras. Esto es fundamental para la localización, así como, la activación de las diferentes proteínas implicadas en el crecimiento axonal, en el cono de crecimiento del futuro axón (Menager et al., 2004; Shi et al., 2003). Tanto es así, que la inhibición de PI3K con inhibidores específicos impide la especificación axonal (Shi et al., 2003). Asimismo, se ha observado la acumulación de PIP<sub>3</sub> de forma selectiva en una única neurita tras el tratamiento con laminina en neuronas hipocampales en estadio 2, el estadio previo a la especificación axonal (Menager et al., 2004).

El proceso de establecimiento de un axón es bastante complejo y no completamente conocido. Resumidamente, la actividad PI3K es necesaria para la modulación en el cono de crecimiento axonal de la actividad de proteínas de la familia de **Rho GTPasas**. Por un lado, la actividad de PI3K y Ras promueven la activación de cdc42 y Rac1 que, como hemos mencionado anteriormente, regulan la dinámica del citoesqueleto de actina, promoviendo el crecimiento de neuritas; de tal forma, que la pérdida de expresión de cdc42 provoca defectos graves durante la especificación axonal (Garvalov et al., 2007; Govek et al., 2005; Schwamborn and Puschel, 2004; Shi et al., 2003). Por el contrario, la activación de RhoA de forma Ras-dependiente, inhibe dicho proceso. La sobreexpresión de una forma constitutivamente activa de RhoA inhibe la neuritogenesis, mientras que el dominante negativo promueve el crecimiento neurítico (Bito et al., 2000; Schwamborn and Puschel, 2004).

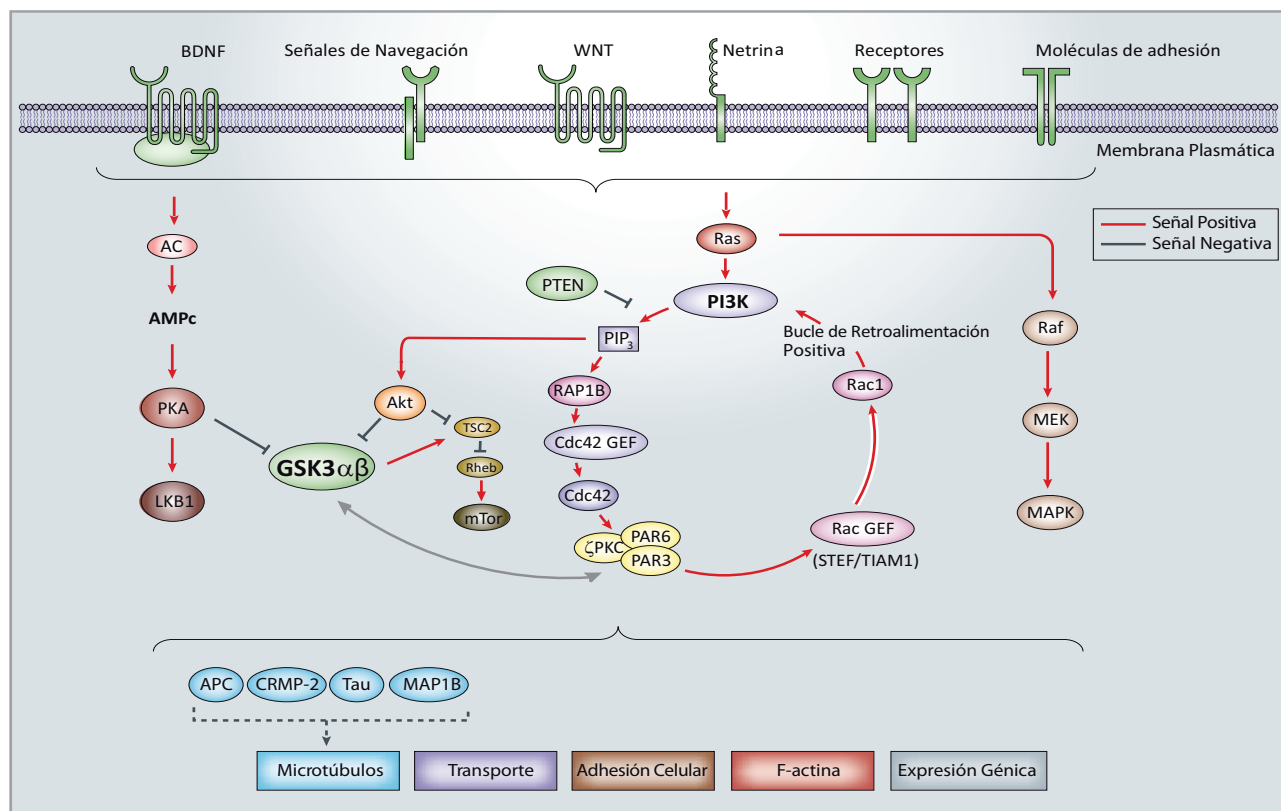


Fig. 12. Vías de señalización intracelulares y polaridad neuronal. Imagen adaptada de Arimura, 2007.

La actividad de PI3K también es necesaria para la regulación del **complejo de polaridad** formado por Par3, Par6 y PKC atípica ( $\zeta$ PKC). La inhibición de PI3K impide la polarización de este complejo de polaridad. Además dicha actividad permite su transporte al cono de crecimiento axonal por la quinesina KIF3 (*Kinesin superfamily protein 3*), y transmite la señal desde Cdc42 a Rac1 a través de Tiam1 (el *guanine nucleotide exchange factor* (GEF) de Rac1). Finalmente Rac1 activa a PI3K para potenciar la señal de especificación axonal, en un bucle de retroalimentación positivo (Nishimura et al., 2004; Nishimura et al., 2005; Ohno, 2001; Shi et al., 2003).

Otra proteína que promueve la especificación axonal es Rap1B (*Ras-related protein 1B*), perteneciente a la superfamilia de Ras GTPasas. Esta proteína se localiza específicamente en el futuro axón previo a la acumulación de Cdc42 y el complejo de polaridad, gracias a la actividad de la vía de PI3K y mTor (*mammalian target of Rapamycin*). La vía de mTor está regulada por AKT y su inhibición bloquea la especificación axonal (Li et al., 2008; Schwamborn and Puschel, 2004). Otros miembros de la familia de Ras GTPasas, como Ras, regulan el establecimiento y el mantenimiento de la polaridad neuronal a través de la activación de PI3K (Oinuma et al., 2007; Yoshimura et al., 2006) y de la **cascada de MAPK** en el cono de crecimiento del futuro

axón (Vojtek et al., 1993).

Asimismo, está ampliamente descrito que PI3K regula la translocación de **AKT** (también llamada proteína quinasa B) a la membrana, un paso esencial para su posterior activación mediante fosforilación en los residuos Thr-308 y Ser-473 por PDK1 e ILK (*Phosphoinositide-dependent kinase-1* e *Integrin-linked kinase*, respectivamente) (Hannigan et al., 2005; Scheid and Woodgett, 2001). De hecho, la actividad de ILK está implicada en el proceso de formación del axón, puesto que su inhibición farmacológica o la reducción de su expresión con RNAi, provoca fallos en el crecimiento axonal, sin afectar la formación del árbol dendrítico (Delcomenne et al., 1998; Guo et al., 2007). La forma activa de AKT se localiza en el cono de crecimiento del axón naciente de una forma polarizada, gracias a un sistema de degradación proteosoma-dependiente que tiene lugar en las dendritas (Schwamborn and Puschel, 2004; Shi et al., 2003; Yan et al., 2006), de tal forma que fosforila a la enzima GSK3 en la serina 9, inhibiendo su actividad, en el cono de crecimiento axonal en neuronas en cultivo (Jiang et al., 2005; Yoshimura et al., 2005).

**GSK3** es una proteína serina treonina quinasa que consta de dos isoformas, GSK3 $\alpha$  y GSK3 $\beta$ , codificadas por genes independientes. En humano y roedor se han descrito dos variantes de splicing de la subunidad  $\beta$ . La isoforma  $\beta$ 1 se expresa de forma ubicua, mientras que la  $\beta$ 2 se expresa específicamente en el sistema nervioso y en grandes niveles durante el desarrollo (Mukai et al., 2002; Woodgett, 1990). Esta proteína está constitutivamente activa y se regula negativamente por fosforilación en los residuos Ser9/21 mientras que la fosforilación en los residuos Tyr279/216 aumenta su actividad. Asimismo, su actividad puede modificarse por la formación de complejos regulados por la vía de Wnt y por su localización intracelular (Grimes and Jope, 2001). GSK3 funciona como regulador clave en múltiples procesos relacionados con el desarrollo como neurogénesis, migración neuronal, polarización y crecimiento axonal; a través de la regulación de factores de transcripción y de la regulación de proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) como CRMP2, APC, Tau y MAP1B (Grimes and Jope, 2001; Zhou and Snider, 2005). Durante la especificación y el crecimiento axonal ambas subunidades están implicadas, localizándose en el cono de crecimiento axonal, y tienen una función dual: su actividad es necesaria para la especificación axonal; sin embargo, una vez generado el axón, su inhibición promueve un incremento en la tasa de crecimiento y ramificación axonal (Garrido et al., 2007). Asimismo, ha sido descrito que la proteína MAP1B tiene sitios de fosforilación específicos para GSK3 $\beta$  que están relacionados con la regulación de la estabilidad de los microtúbulos durante la elongación axonal (Scales et al., 2009). En el cono de crecimiento axonal, la actividad de GSK3 está modulada por vías de señalización, como la inducida por factores de crecimiento y por la vía de Wnt (Grimes and Jope, 2001), además de otras como la vía de PKA/LKB1 (Asada et al., 2007; Shelly et al., 2010). A su vez, GSK3 puede modular la actividad y localización de otras proteínas como Par3 (Shi et al., 2004) o mTor (Inoki et al., 2006).

Todas estas vías de señalización, que estudiaremos en apartados posteriores, están implicadas en el proceso de elongación axonal, lo que nos sugiere que GSK3 podría estar funcionando como señal coordinadora e integradora de la señalización que regula el proceso de adquisición de la polaridad neuronal y la elongación axonal.

### 2.2.2. Segundos mensajeros celulares y polaridad neuronal.

En los últimos años, se está prestando más atención al estudio de la implicación de los segundos mensajeros durante el proceso de adquisición de polaridad neuronal y guía axonal, concretamente al AMP cíclico (AMPc) y al calcio (Ca<sup>2+</sup>) intracelular.

El **AMPc** es un segundo mensajero celular que se sintetiza por la enzima adenilato ciclasa, que regula diferentes



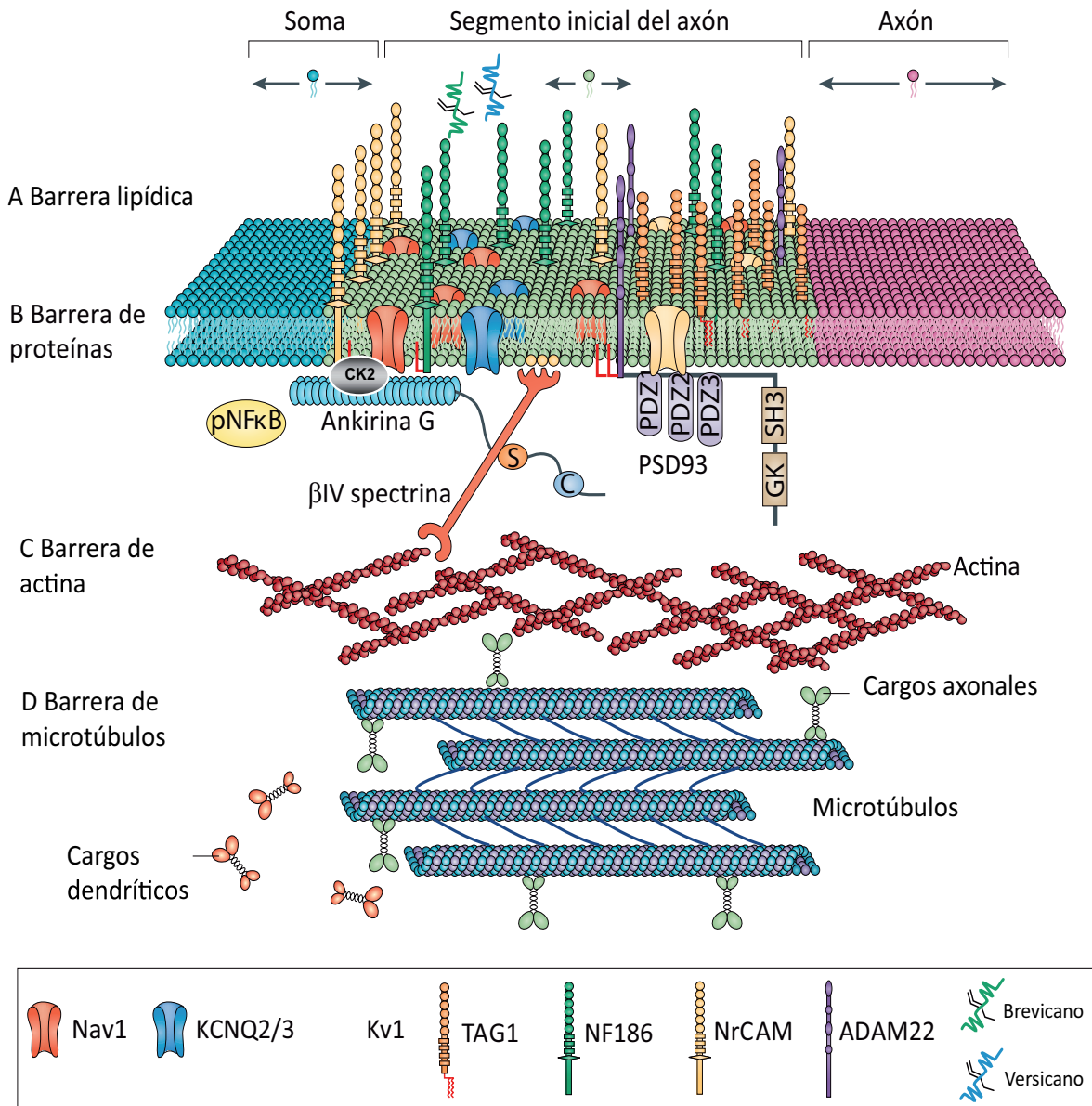
vías de señalización intracelulares a través de la fosforilación de proteínas como PKA. En estudios recientes se ha descrito la relación directa entre este segundo mensajero y el establecimiento de la polaridad neuronal. Para ello, se han utilizado sondas específicas que detectan la variación de concentración de AMPc mediante técnicas de FRET. Con esta metodología, se ha observado que el aumento de la concentración de AMPc en una neurita indiferenciada promueve la diferenciación axonal; sin embargo, las variaciones en la concentración de GMPc tienen efectos antagónicos promoviendo el desarrollo dendrítico. Además, las variaciones de AMPc influyen en la concentración de GMPc, un aumento de AMPc supone una disminución de GMPc y viceversa, por tanto el balance AMPc/GMPc regula de manera coordinada la diferenciación axón/dendritas (Shelly et al., 2010). En cuanto a la vía de señalización, el AMPc en el futuro axón, induce la activación localizada de PKA (Proteína quinasa A) que fosforila a LKB1 en el residuo Ser431. La acumulación del dímero LKB1/STRAD (*Ste20 Related Adaptor*) fosforilado, genera una señal temprana para que una neurita indiferenciada se transforme en axón (Shelly et al., 2007). Además de la fosforilación de LKB1, el aumento de AMPc y la activación de PKA suponen un incremento en la fosforilación, y por tanto la inhibición de GSK3, promoviendo el crecimiento axonal una vez especificado el axón, como hemos visto en apartados anteriores (Garrido et al., 2007; Shelly et al., 2007; Shelly and Poo, 2011).

En el caso del **Ca<sup>2+</sup> intracelular**, diferentes estudios han mostrado que el calcio puede regular la motilidad de los conos de crecimiento y la elongación de neuritas a través de la modulación del estado de polimerización de los filamentos de actina y microtúbulos (Mattson and Kater, 1987). Sus efectos en el citoesqueleto están mediados por modificaciones directas en proteínas del citoesqueleto o por la activación de proteínas de unión a calcio, tales como calmodulina o calcineurina. Ésta última es una fosfatasa dependiente de calcio, que está directamente implicada en la adquisición de polaridad neuronal (Ferreira et al., 1993). En los primeros estudios *in vitro*, se observó que los axones de neuronas hipocampales mantenidas en cultivo, presentaban una baja concentración de calcio intracelular en comparación con las dendritas y que la exposición de estas neuronas a agentes que elevan el calcio intracelular reducía la tasa de crecimiento axonal (Mattson et al., 1990). Estudios posteriores *in vivo*, han confirmado que las variaciones de calcio en el cono de crecimiento regulan la elongación axonal, siendo este segundo mensajero un regulador negativo de este proceso (Gomez and Spitzer, 1999).

### 3. MANTENIMIENTO DE LA POLARIDAD NEURONAL Y EL SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN.

Hasta el momento, hemos descrito el proceso de adquisición de polaridad en sus fases iniciales. En este capítulo vamos a estudiar una estructura esencial para el mantenimiento de la polaridad y funcionalidad neuronal en estadios posteriores: el segmento inicial del axón (SIA). El SIA es una estructura única, estratégicamente localizada en la zona más proximal del axón, donde funciona como una barrera física regulando la difusión de proteínas a través de la membrana, así como el transporte citoplásmico entre los dominios somatodendrítico y axonal. Se considera un dominio axonal esencial para la generación del potencial de acción (Stuart et al., 1997).

El SIA tiene una **composición molecular** específica (Fig. I3), que le permite desarrollar sus funciones durante el procesamiento de la información. La iniciación del potencial de acción, requiere una alta concentración de canales de Na<sup>+</sup> voltaje dependientes, incluyendo los siguientes subtipos: Nav 1.1, Nav1.2 y Nav1.6 que van intercambiándose a lo largo del desarrollo (Boiko et al., 2003; Kole et al., 2008). Mientras que la amplitud, duración y la frecuencia del potencial de acción está modulada por canales de K<sup>+</sup> voltaje dependientes. En el SIA encontramos los siguientes subtipos: KCNQ2/3, Kv2.2 y Kv1.1/1.2/1.4/β2 (Johnston et al., 2008; Kole et al., 2007; Ogawa et al., 2008; Pan et al., 2006). Por otro lado, en el SIA encontramos moléculas de adhesión



**Fig. 13. Estructura y composición del SIA.** A-D Diferentes barreras en el SIA desde la membrana al citoplasma impiden la segregación dendritas-axón, responsable de la identidad neuronal. Imagen adaptada de Rasband, 2010.

celular, tales como NF-186 y NrCAM, (miembros de la familia L1) y el heterodímero compuesto por TAG-1 y Caspr2. La función de estas moléculas se desconoce, aunque sí sabemos que NF-186 es necesario para el ensamblaje de los componentes de la matriz extracelular que rodean el SIA, tales como tenascina-R, agregano y brevicano (Bruckner et al., 2006; Hedstrom et al., 2007; Ogawa and Rasband, 2008). Todos estos componentes del SIA están anclados al citoesqueleto a través de scaffolding proteins o proteínas de anclaje, como PSD-93 y ankirina G, y proteínas del citoesqueleto, como βIV-espectrina. Ankirina G se une a βIV-espectrina, que a su vez interacciona con el citoesqueleto de actina que presenta el SIA (Ogawa et al., 2008; Ogawa and Rasband, 2008).

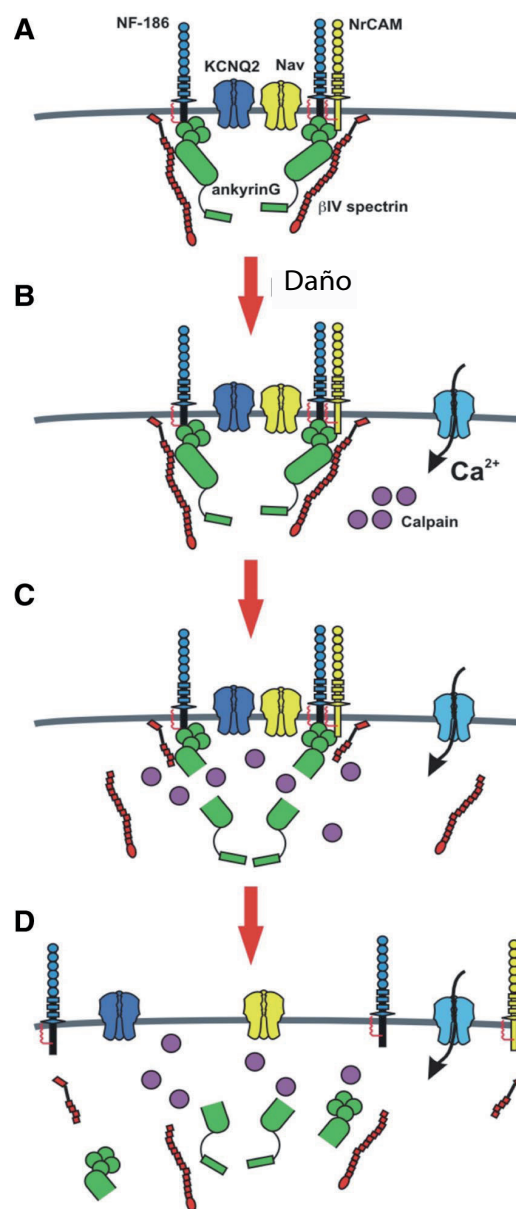
En cuanto a la **formación del SIA**, se ha descrito que el bloqueo de la expresión de ankirina G con RNA de interferencia impide la localización específica de los componentes del SIA (Jenkins and Bennett, 2001; Pan et al., 2006; Zhou et al., 1998), por lo que ankirina G funciona como andamio al que las proteínas integrantes del SIA se unen de forma directa o indirecta.

Una vez formado el SIA, se genera una barrera de difusión, que restringe de forma selectiva el transporte de



lípidos, proteínas citoplásmicas y de membrana y el transporte de vesículas entre los compartimentos somatodendrítico y axonal (Nakada et al., 2003). Para ello,  $\beta$ IV-espectrina se une al citoesqueleto de actina del SIA estabilizándolo (Nishimura et al., 2007). La proteína de anclaje ankirina G, también juega un papel importante en el **mantenimiento del SIA** en neuronas maduras, puesto que su silenciamiento en este estadio de desarrollo, genera su desensamblaje (Hedstrom et al., 2008). Asimismo, este dismantelamiento del SIA provoca que el axón adquiera características moleculares y estructurales de las dendritas, incluyendo la localización proteínas MAP2, el cotransportador KCC2 y la formación de espinas ricas en PSD-95 (Hedstrom et al., 2008), causando una ola de desdiferenciación neuronal. Por tanto la integridad del SIA es indispensable para el mantenimiento de la polaridad neuronal a través de la formación de la barrera de difusión.

El dismantelamiento del SIA y la pérdida de polaridad neuronal se ha observado en **condiciones patológicas**, como por ejemplo la isquemia (**Fig. I4**). En estas condiciones se produce una proteólisis de ankirina G y  $\beta$ IV-espectrina debida a la activación calcio dependiente de la proteasa calpaína (Schafer et al., 2009). Esto sugiere, que las neuronas dañadas pierden la funcionalidad debido a la pérdida de polaridad neuronal y de canales de  $\text{Na}^+$ . La pérdida de polaridad neuronal también se ha relacionado con la patofisiología de los desórdenes cognitivos y mentales, como el desorden bipolar, el autismo, el retraso mental y la esquizofrenia (Cruz et al., 2009; Chen et al., 2009; Ferreira et al., 2008).



Pérdida de la concentración de proteínas del SIA

**Fig. I4.** Desensamblaje del SIA tras un daño en el sistema nervioso central. A-D. La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  provoca la activación de calpaína y la degradación de proteínas del SIA tras sufrir un daño neuronal.

#### 4. NUCLEÓTIDOS Y RECEPTORES PURINÉRGICOS EN EL SISTEMA NERVIOSO.

Tradicionalmente, los nucleótidos como el ATP se han estudiado como la base en el intercambio energético durante procesos metabólicos celulares. Fue en 1972 cuando Geoffrey Burnstock introdujo el concepto de neurotransmisión mediada por nucleótidos (Burnstock, 1972) demostrando que el ATP extracelular actuaba como neurotransmisor en los inicialmente llamados nervios inhibitorios no adrenérgicos no colinérgicos (NANC) de cobaya (Burnstock, 1976). Este novedoso hallazgo abrió nuevos campos de estudio sobre los nucleótidos extracelulares y sus funciones en el sistema nervioso. A lo largo de estos años se ha estudiado su papel en la neurotransmisión y neuromodulación (Burnstock, 2007a; Burnstock, 2009), su implicación en efectos tróficos a largo plazo en las células neurales, tales como la diferenciación, supervivencia o muerte

celular (Zimmermann, 2006); así como su participación en diversas condiciones patológicas asociadas al sistema nervioso (Abbraccio and Burnstock, 1998). En este capítulo estudiaremos en detalle la señalización mediada por nucleótidos y sus receptores, y las funciones que median en los procesos fisiológicos y patofisiológicos del sistema nervioso.

#### 4.1. ALMACENAMIENTO, LIBERACIÓN E HIDRÓLISIS EXTRACELULAR DE LOS NUCLEÓTIDOS.

El ATP y otros nucleótidos se almacenan en vesículas para su posterior liberación al medio extracelular, como las vesículas aminérgicas y colinérgicas en tejidos neurales o neuroendocrinos, o los gránulos de plaquetas y mastocitos (Burnstock, 2007a). La acumulación de ATP en dichas vesículas está mediada por un transportador vesicular de nucleótidos, que está altamente expresado en cerebro, de una forma  $\text{Cl}^-$  dependiente (Sawada et al., 2008). Sus propiedades cinéticas exhiben una regulación mnemónica ampliamente estudiada (Gualix et al., 1996; Gualix et al., 1999).

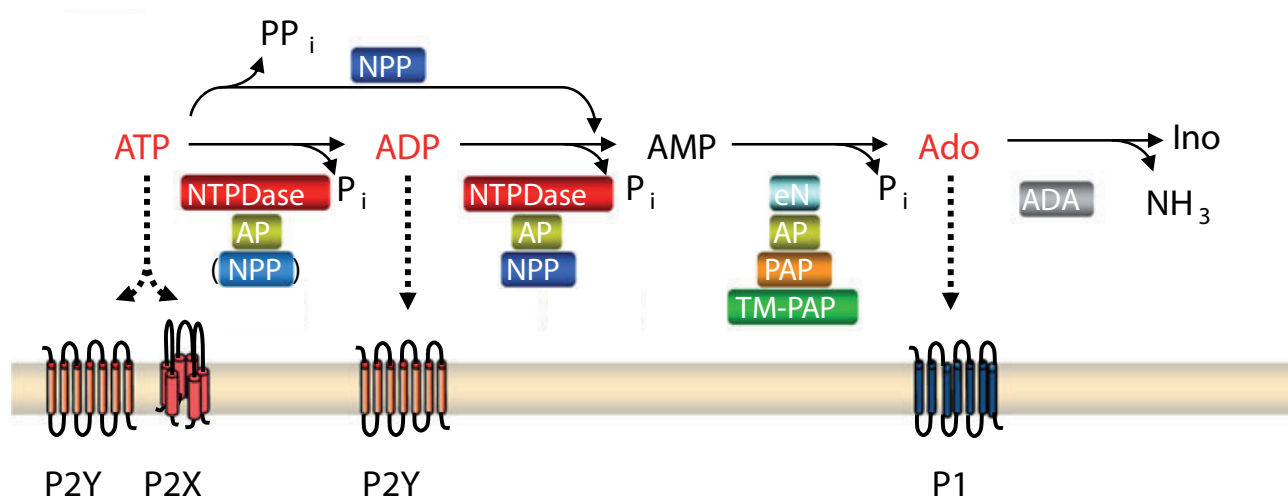
El ATP probablemente esté presente en todas las vesículas sinápticas o secretoras, aunque en diferentes concentraciones y puede ser almacenado y liberado junto con otros neurotransmisores llevando a cabo funciones de co-transmisor en diferentes áreas del sistema nervioso (Barberis and McIlwain, 1976; Sperlagh et al., 1998; White, 1977). (**Tabla I1**). Algunos terminales neuronales podrían contener vesículas con ATP como único neurotransmisor (Pankratov et al., 2006).

Co-transmisores	Tipo de neurona	Referencias
<b>ATP + Acetilcolina</b>	Córtex y núcleo caudado.	(Potter and White, 1980; Richardson and Brown, 1987)
<b>ATP + Noradrenalina</b>	Córtex, hipotálamo y <i>locus coeruleus</i> .	(Buller et al., 1996; Kapoor and Sladek, 2000; Poelchen et al., 2001; Potter and White, 1980; Sperlagh et al., 1998)
<b>ATP + GABA</b>	Hipotálamo, asta dorsal y retina.	(Jo and Role, 2002; Perez and Bruun, 1987)
<b>ATP + Glutamato</b>	Hipocampo y asta dorsal.	(Fujii et al., 2004; Mori et al., 2001)
<b>ATP + Dopamina</b>	Sistema mesolímbico.	(Krugel et al., 2003)

**Tabla I1.** Almacenamiento y co-liberación del ATP junto con otros neurotransmisores en el sistema nervioso central. Adaptado de Abbraccio, 2008.

En cuanto a la **liberación de nucleótidos**, está ampliamente descrita la liberación cuantal de ATP en forma de vesículas desde los terminales neuronales (Pankratov et al., 2006). Incluso algunos estudios defienden la liberación de ATP por parte de los astrocitos (Bowser and Khakh, 2007), quizá mediada por los lisosomas (Zhang et al., 2007). Sin embargo, la señalización extracelular mediada por ATP y nucleótidos está tan ampliamente extendida que deben existir mecanismos diferentes de liberación de nucleótidos, además de la exocitosis mediada por vesículas. Algunas evidencias relacionan a proteínas de membrana tales como miembros de la familia ABC (transportadores dependientes de hidrólisis de ATP), miembros de la familia ecto-ATPasas, hemicanales de conexinas y panexinas (Scemes et al., 2007) o canales aniónicos dependientes de voltaje como posibles mediadores de la liberación no exocitótica de nucleótidos (Dubyak, G.R. 2006). De hecho está descrita la implicación de algunos hemicanales en la liberación de ATP relacionada con procesos de isquemia (Thompson et al., 2006).

Los efectos fisiológicos de los nucleótidos extracelulares finalizan por la acción de enzimas **ectonucleotidasas** de la membrana plasmática. Estas enzimas generan fosfato libre y los correspondientes nucleósidos como productos finales de la hidrólisis de los nucleótidos. Las ectonucleotidasas no sólo controlan la vida media de los nucleótidos, sino que a su vez producen nuevos ligandos para los diferentes receptores purinérgicos. (Zimmermann, 2000), como observamos en la figura I5. Todas las familias de ectonucleotidasas se expresan en cerebro y son las siguientes: E-NTPDasas (ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasas), E-NPPs (ectonucleótido pirofosfatasa y/o fosfodiesterasa), alcalin fosfatasa y ecto-5'-nucleotidasas. Estas enzimas difieren tanto en la especificidad del sustrato como en el tipo de producto generado. Además de las vías catabólicas, existen enzimas que permiten la refosforilación y la síntesis extracelular de ATP, como son la ectonucleosido difosfato quinasa y la adenilato quinasa (Zimmermann et al., 2012).



**Fig.I5. Vías principales asociadas al metabolismo de los nucleótidos extracelulares.** ADA = ecto-adenosina deaminasa, AP = fosfatasa alcalina, eN= ecto-5-nucleotidasa, NPP= ecto-nucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa, NTPDase= ecto-nucleosido trifosfato difosfohidrolasa, PAP= fosfatasa ácido prostática, TM-PAP= PAP transmembrana, Ado= adenosina, Ino= inosina. Imagen adaptada de Zimmermann, 2012.

## 4.2. RECEPTORES PURINÉRGICOS.

Los receptores purinérgicos son receptores de membrana activados por purinas. Los primeros receptores se clonaron en 1978 y ya entonces se dividieron en dos familias (Burnstock G. 1978): aquellos activados por adenosina o receptores P1 y receptores P2 que tienen como agonista fosfonucleótidos. Los receptores P2 se dividen a su vez en dos grandes familias atendiendo a su estructura molecular, farmacología y a los mecanismos de transducción de señales que desencadenan: canales iónicos activados por ligando o receptores P2X y receptores acoplados a proteínas G, también llamados receptores P2Y (Abbracchio and Burnstock, 1994). En este estudio nos hemos centrado en la implicación de los receptores P2 en el desarrollo neuronal, cuya clasificación y características más destacadas estudiaremos en los siguientes apartados.

### 4.2.1. Receptores Purinérgicos P2X.

Los receptores purinérgicos P2X son canales iónicos anclados a la membrana plasmática regulados por ligando, el ATP extracelular. Los receptores P2X son permeables a  $Na^+$ , el  $K^+$  o el  $Ca^{2+}$ , permitiendo la entrada de  $Na^+$

y  $\text{Ca}^{2+}$  y la salida de  $\text{K}^{+}$  de interior de la célula, provocando un estado de despolarización en la membrana plasmática. Cabe destacar la elevada permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$ , similar o incluso superior a la descrita para los canales de acetilcolina o glutamato (Egan and Khakh, 2004), sin embargo esta permeabilidad varía en función de la subunidad implicada (Egan et al., 2006).

En la actualidad han sido descritas siete subunidades diferentes nombradas de P2X1 a P2X7, que se ensamblan formando homo- o heterotrómeros dando lugar a canales funcionales (Nicke et al., 1998; North, 2002; Torres et al., 1999; Vial et al., 2004). Las subunidades P2X comparten una significativa homología de secuencia entre sí, alrededor del 40-50% de aminoácidos idénticos, y no tienen relación secuencial ni estructural con los receptores ionotrópicos de otros neurotransmisores, como las familias de receptores GluR, GABA<sub>A</sub> y nAChR (Dani and Mayer, 1995). Por tanto, constituyen una familia diferenciada dentro del grupo de canales iónicos activados por ligando.

Todas las subunidades P2X poseen dos segmentos hidrofóbicos transmembrana (TM1 y TM2), el primero relacionado con la apertura del canal y el segundo con la formación del poro, que permite la entrada de iones. Ambos extremos, N- y C-terminal son intracelulares y poseen motivos de unión para quinasas intracelulares, mientras que el bucle extracelular formado entre TM1 y TM2 contiene diez residuos conservados de cisteína, que forman series de puentes disulfuro contribuyendo a la estructura terciaria de la proteína y regulando la translocación del receptor a la membrana (Clyne et al., 2002b; Ennion and Evans, 2002). Asimismo, presentan una región H5 hidrofóbica cercana al poro relacionada con la unión de metales e iones  $\text{H}^{+}$ , que regulan la actividad del canal (Clyne et al., 2002a) y un dominio de unión a ATP y de interacción con los antagonistas (Egan et al., 2006; Roberts et al., 2006; Stojilkovic et al., 2005). Los receptores P2X se encuentran glicosilados en el dominio extracelular y esta glicosilación es necesaria para la inserción de las proteínas en la membrana plasmática, a la vez que potencian la unión del ligando (Rettinger et al., 2000).

#### 4.2.2. Receptores Purinérgicos P2Y.

Todos los receptores P2Y se incluyen en la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) compartiendo subfamilia con los receptores de opioides, cannabinoides y adenosina entre otros (Lagerstrom and Schioth, 2008). Estos receptores constan de siete dominios transmembrana, el extremo N-terminal es extracelular y el C-terminal citosólico. La homología de secuencia no es alta, del orden del 35-40%, pero sí es suficiente para configurar una familia definida dentro de la superfamilia GPCR (Barnard et al., 1994).

Estos receptores responden a nucleótidos de purinas y pirimidinas y se conocen ocho tipos diferentes, que se dividen en dos subfamilias en función de su similitud filogenética, de la presencia de aminoácidos importantes para la unión del ligando y su selectividad de unión a proteína G: la subfamilia formada por P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 y P2Y11, que se acoplan a proteínas  $G_{q/11}$  para activar la vía de liberación de calcio del retículo endoplásmico mediada por fosfolipasa C y la activación de proteína quinasa C (PKC) (Erb et al., 2006; Verkhatsky, 2005); y la formada por P2Y12, P2Y13 y P2Y14 que se acoplan a proteína  $G_{i/o}$  para inhibir adenilato ciclasa y modular canales iónicos (Abbracchio et al., 2006; Burnstock, 2007b). Mientras que todos los receptores P2X tienen como agonista al ATP, los receptores P2Y presentan diferentes agonistas en función del subtipo de receptor, como observamos en la figura I6.

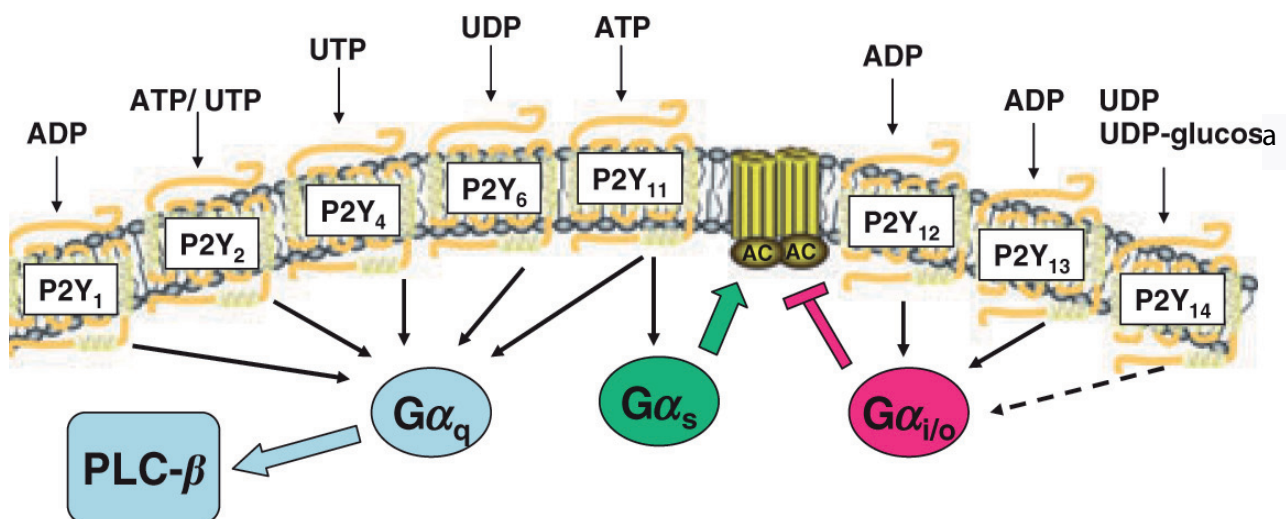


Fig.I6. Agonistas de los receptores P2Y y mecanismos de señalización conocidos. Imagen adaptada de Harden, 2010.

#### 4.3. FUNCIÓN DE LOS RECEPTORES PURINÉRGICOS P2 EN EL SISTEMA NERVIOSO.

Como hemos comentado anteriormente, los nucleótidos extracelulares y los receptores purinérgicos están relacionados con funciones importantes relacionadas con la fisiología del sistema nervioso, tales como la neurotransmisión o neuromodulación y la comunicación neurona-glía; y con procesos de desarrollo y plasticidad. En este apartado se describe con mayor detalle la implicación de la señalización purinérgica en estos procesos.

##### 4.3.1. Receptores purinérgicos, neurotransmisión y neuromodulación en el sistema nervioso central.

La **neurotransmisión purinérgica** mediada por ATP a través de los receptores P2X, se ha demostrado solamente en áreas muy discretas del sistema nervioso central, a pesar de la elevada expresión de receptores purinérgicos en sus diferentes áreas. Se observó inicialmente en la habénula medial (Edwards et al., 1992) y también se ha descrito en la médula espinal (Bardoni et al., 1997), locus coeruleus (Nieber et al., 1997), hipocampo (Mori et al., 2001; Pankratov et al., 1998) y corteza somato-sensorial (Pankratov et al., 2002), donde además sólo una pequeña proporción de sinapsis utiliza ATP como neurotransmisor único.

En el caso de los receptores P2Y, regulan la transmisión sináptica a través de la modulación de diversos canales iónicos, como los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  activados por voltaje, canales de  $\text{K}^+$  y receptores relacionados como los NMDA o incluso los P2X, modificando la transmisión sináptica tanto en el componente presináptico como en el postsináptico (Filippov et al., 1998; Ikeuchi and Nishizaki, 1995; Luthardt et al., 2003; Nakamura and Strittmatter, 1996).

Asimismo, los receptores purinérgicos están presentes en la zona presináptica, y por ello, una de sus funciones principales es la de **modular los procesos de neurotransmisión**, regulando la liberación de neurotransmisores

Receptor	Localización	Neurotransmisor	Referencia.
<b>P2X</b>	Cerebro Medio, Tallo cerebral	Glutamato	(Gualix et al., 2003; Shigetomi and Kato, 2004)
	Medula espinal, Tallo cerebral	Glicina	(Rhee et al., 2000); (Wang et al., 2001)
<b>P2X1</b>	Hipocampo	Glutamato	(Khakh et al., 2003; Mendoza-Fernandez et al., 2000; Papp et al., 2004; Rodrigues et al., 2005)
<b>P2X2</b>	Hipocampo	Glutamato	(Khakh et al., 2003; Mendoza-Fernandez et al., 2000; Papp et al., 2004; Rodrigues et al., 2005)
	Medula espinal	GABA	(Hugel and Schlichter, 2000)
<b>P2X3</b>	Hipocampo	Glutamato	(Khakh et al., 2003; Mendoza-Fernandez et al., 2000; Papp et al., 2004; Rodrigues et al., 2005)
	Cerebro medio	GABA	(Gomez-Villafuertes et al., 2001)
	Cerebro medio	Acetilcolina	(Diaz-Hernandez et al., 2002)
<b>P2X7</b>	Medula espinal, hipocampo	Glutamato	(Ando and Sperlagh, 2012); (Khakh et al., 2003; Mendoza-Fernandez et al., 2000; Papp et al., 2004; Rodrigues et al., 2005)).
	Hipocampo	GABA	(Papp et al., 2004)
<b>P2Y</b>	Corteza	Noradrenalina, Serotonina	(von Kugelgen et al., 1997; von Kugelgen et al., 1994)
<b>P2Y1</b>	Hipocampo	Glutamato	(Khakh et al., 2003; Mendoza-Fernandez et al., 2000; Papp et al., 2004; Rodrigues et al., 2005)
<b>P2Y2</b>	Hipocampo, Habénula medial	Glutamato	(Khakh et al., 2003; Mendoza-Fernandez et al., 2000; Papp et al., 2004; Rodrigues et al., 2005); (Price et al., 2003)
<b>P2Y4</b>	Hipocampo	Glutamato	(Khakh et al., 2003; Mendoza-Fernandez et al., 2000; Papp et al., 2004; Rodrigues et al., 2005)

**Tabla I2. Efectos neuromoduladores de la transmisión sináptica mediados por receptores purinérgicos en el sistema nervioso.**  
Efectos positivos (verde) y efectos inhibitorios (rojo).

(Cunha and Ribeiro, 2000). Generalmente, los efectos potenciadores están mediados principalmente por los receptores P2X; sin embargo, los efectos inhibidores suelen implicar receptores del tipo P2Y (**Tabla I2**).

La activación de los receptores P2X está implicada en la **regulación de la plasticidad sináptica** en varios circuitos neuronales, aunque su papel en el control del LTP y LTD es controvertido, puesto que diferentes grupos postulan efectos positivos, negativos o nulos (Pankratov et al., 2009).

#### 4.3.2. Desarrollo y Plasticidad del Sistema Nervioso Central.

El papel que juega la señalización purinérgica en procesos de proliferación, migración, diferenciación y muerte de las células relacionadas con el desarrollo del cerebro y la médula espinal, así como en procesos de remodelación y plasticidad del sistema nervioso, ha generado un gran interés en los últimos años (Ulrich et al., 2012).



Está ampliamente descrito, que el ATP, a través del receptor P2Y1 está implicado en la **especificación de las capas corticales**. Su activación genera un incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  en la glía radial, que induce la liberación de factores de crecimiento, ATP y otros neurotransmisores a través de conexinas y hemicanales (Wiencken-Barger et al., 2007). El ATP liberado activa receptores P2Y1 en células vecinas, generando una ola de calcio que favorece la proliferación y sincronización de la glía radial en fase S del ciclo de división (Striedinger et al., 2007; Weissman et al., 2004). De hecho, en neuroesferas disociadas a partir del ratón deficiente en P2Y1, dicha proliferación se ve reducida, incluso en presencia de factores de crecimiento (Mishra et al., 2006). La glía radial se divide asimétricamente, generando una célula progenitora que se mantiene en división y una célula que migra dorsalmente para diferenciarse en células especializadas (Anthony et al., 2004; Noctor et al., 2001; Noctor et al., 2002; Rakic, 2003). El receptor P2Y1 es fundamental para que tenga lugar dicha migración, puesto que este proceso sufre un retraso al inhibir o silenciar dicho receptor con técnicas de ARN de interferencia (Liu et al., 2008). En trabajos posteriores se ha analizado la implicación de otros subtipos de receptores durante el proceso de proliferación de precursores, como los receptores P2X3, P2X4, P2Y1 y P2Y2 que se expresan en una línea de células madre y cuya activación estimula su proliferación a través de la activación de PKC, AKT y MAPK, que inducen la expresión y activación de ciclinas y Cdks, implicadas en este proceso (Heo and Han, 2006). Los receptores purinérgicos, no sólo están implicados en el desarrollo de la corteza cerebral, también están relacionados con los procesos de proliferación de progenitores neuronales de la retina a través del receptor P2Y1 (Nunes et al., 2007).

La **supervivencia** de células neurales también está regulada por receptores purinérgicos. Está descrito que el receptor P2Y2 inhibe la apoptosis de las células neurales (Arthur et al., 2006). Este receptor junto con el P2Y4 incrementa la tasa de supervivencia en neuronas derivadas de precursores del cerebro medio, mientras que la activación de P2Y1, P2Y12 y P2Y13 con ADP provoca la muerte de dichas neuronas (Delic and Zimmermann, 2010). Por otro lado, el receptor P2X7 está relacionado con la muerte celular durante la neurogénesis, eliminando células que no son necesarias para la diferenciación y sinaptogénesis, como es el caso de los oligodendrocitos mielinizantes, cuyo número viene definido por la actividad de dicho receptor durante el desarrollo (Baumann and Pham-Dinh, 2001).

En cuanto a la **diferenciación neuronal**, sabemos que la activación de receptores P2Y y P2X promueve la formación y diferenciación de neuronas dopaminérgicas (Delic and Zimmermann, 2010). Además, los receptores P2X2 y P2X2/6 contribuyen a la diferenciación a fenotipo neuronal gracias a la expresión de receptores de glutamato y acetilcolina funcionales (Resende et al., 2007), observándose un incremento de su expresión en neuronas diferenciadas a partir de precursores embrionarios de telencéfalo de rata (Schwindt et al., 2011). La expresión de estos dos receptores P2X2 y P2X6, junto con el receptor P2X4, presenta un patrón de expresión diferencial a lo largo de la diferenciación neuronal: la expresión del receptor P2X4 es elevada en células embrionarias y desciende cuando dichas células se diferencian en neuronas, mientras que la expresión de los receptores P2X2 y P2X6 aumenta a lo largo del proceso de diferenciación (Resende et al., 2008). Por otro lado, se ha descrito la expresión de los receptores P2X2, P2X5, P2X7, P2Y1, P2Y2 y P2Y6 en una línea de células madre que se diferencian en neuronas gabaérgicas (Khaira et al., 2009). Finalmente, una vez adquirida la naturaleza neuronal, tiene lugar la adquisición de polaridad y crecimiento axonal y la formación de redes neuronales. Actualmente sabemos que la activación de los receptores P2X1, P2X2/3 y P2X3 inhibe el crecimiento axonal en explantes de tubo neural (Cheung et al., 2005), mientras que los receptores P2X1, P2X2 y P2X4 pueden tener un papel importante en la formación de redes neuronales durante el desarrollo del hipocampo (Heine et al., 2006; Rathbone et al., 1999).

Una vez formado el sistema nervioso central, los receptores purinérgicos también participan en procesos

de **plasticidad y remodelación**. Un ejemplo son los procesos de proliferación neurogénica que tienen lugar en el cerebro adulto. Estos procesos están mediados por ADP y UTP a través de los receptores P2Y1/P2Y13 y P2Y2/P2Y4 respectivamente, junto con factores de crecimiento (Grimm et al., 2009; Mishra et al., 2006). Asimismo, se ha observado en el epitelio olfatorio, que las células apoptóticas liberan nucleótidos que inducen neurogénesis a través de olas de calcio, para reemplazar las neuronas muertas (Hassenklover et al., 2009). Finalmente, se ha descrito que los impulsos nerviosos provocan la liberación de ATP generando gliogénesis en cultivos de neuronas hipocampales (Cohen and Fields, 2008).

#### 4.3.3. Señalización purinérgica en las redes de comunicación neurona-glía.

Las redes neuronales, integradas a través de procesos excitatorios eléctricos y contactos sinápticos, están embebidas en un sincitio glial, que utiliza la difusión de iones, segundos mensajeros y metabolitos como medio de comunicación para modular la transmisión sináptica neuronal (Newman, 2003; Verkhratsky and Toescu, 2006). El ATP tiene un papel especial en las redes de señalización neurona-glía, en consecuencia, todos los tipos de glía, del sistema nervioso periférico (células de Schwann) y central (astrocitos, oligodendrocitos y microglía) expresan receptores purinérgicos funcionales de tipo P2X y P2Y (Carrasquero et al., 2005; Fields and Burnstock, 2006; Hamilton et al., 2008; Kirischuk et al., 1995; Moller et al., 2000).

La activación de los receptores P2 en **astrocitos** mediada por ATP u otros nucleótidos, induce cambios a corto plazo, como incrementos en la concentración de calcio intracelular (Fumagalli et al., 2003); y a largo plazo, tales

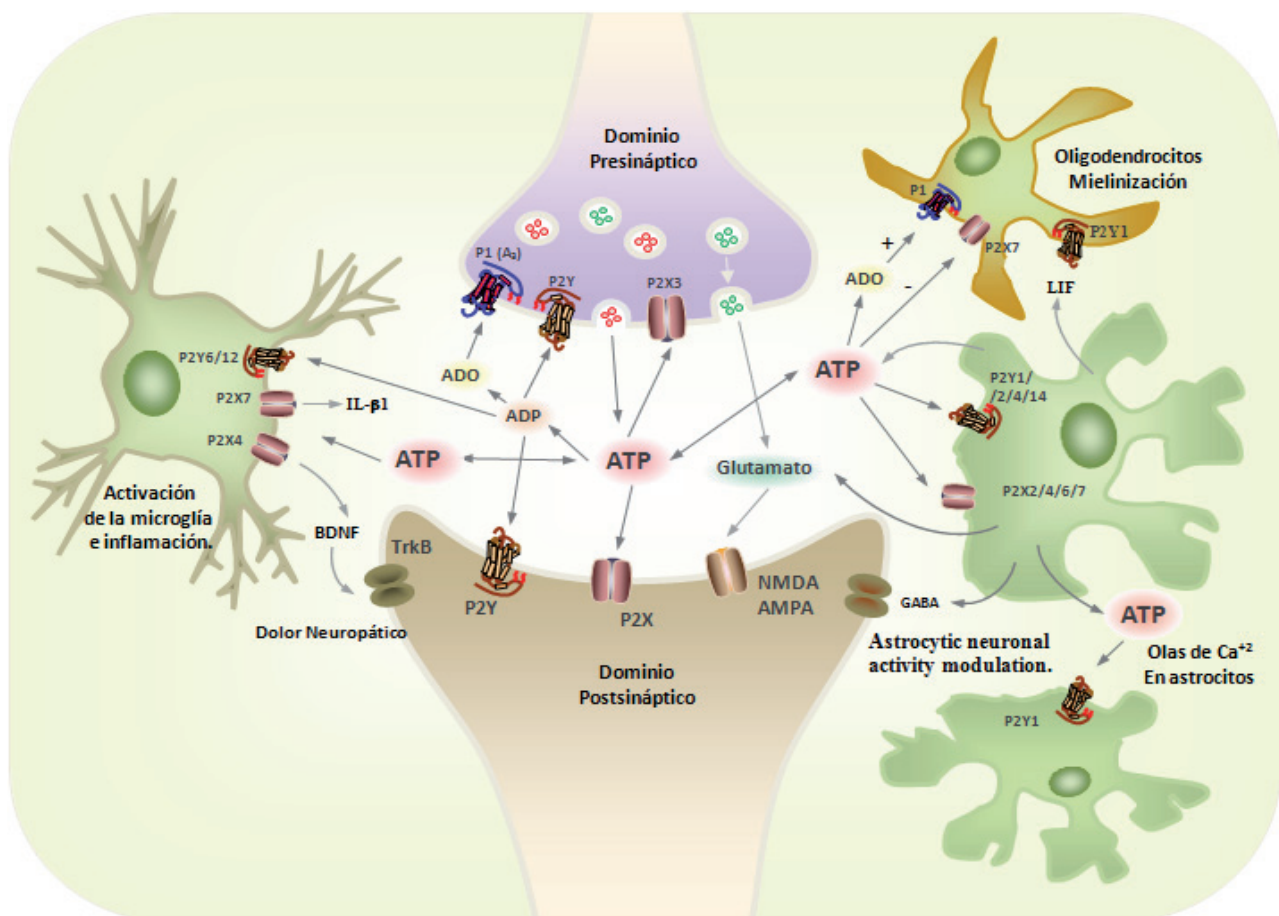


Fig.17 Resumen de los mecanismos de regulación neurona-glía mediados por los nucleótidos extracelulares y los receptores purinérgicos. Imagen adaptada de Burnstock, 2010.



como modificaciones en la proliferación, diferenciación y muerte celular (Cotrina et al., 2000). La estimulación de los astrocitos, induce la liberación de ATP, que inicia y mantiene olas de calcio gracias a la activación de receptores P2Y1 en los astrocitos adyacentes, un proceso similar al observado en la glía radial durante el desarrollo de la corteza cerebral (Weissman et al., 2004). Estas olas de calcio están consideradas como un sistema de procesamiento de información que opera en paralelo con los circuitos neuronales (Fam et al., 2003). Además de ATP, los astrocitos liberan aminoácidos neurotransmisores, tanto excitatorios (glutamato, aspartato) (Duan et al., 2003) como inhibitorios (GABA) (Kang et al., 1998; Wang et al., 2002) a través del receptor P2X7, modulando tanto la transmisión sináptica en sistemas neuronales, como la propagación de ondas de calcio en las redes de astrocitos (Innocenti et al., 2000; Newman, 2003).

Por otro lado, las células de la **microglía** actúan como sensores frente a un amplio rango de estímulos en determinadas condiciones patológicas (Kreutzberg, 1996). Estos estímulos activan la microglía induciendo cambios en su morfología y expresión génica, así como su proliferación, migración y acumulación en los sitios de daño. Asimismo, la microglía activada libera mediadores químicos como las citoquinas inflamatorias que desencadenan respuestas inmunes y modifican la función de la red neuronal adyacente (Hanisch, 2002). Uno de los estímulos principales que desencadenan esta respuesta inmune es el ATP y otros nucleótidos (Davalos et al., 2005; Haynes et al., 2006; Ohsawa et al., 2007; Xiang et al., 2006), que en función de su concentración puede actuar a través de receptores P2Y (bajas concentraciones de ATP) o mediante el receptor P2X7 (elevadas concentraciones de ATP) (McLarnon, 2005). La activación del receptor P2X7 en microglía media daño neuronal en co-cultivos de neuronas corticales y microglía de rata (Skaper et al., 2006), asimismo, esta activación incrementa la expresión de la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS) de tipo II mediada por IFN- $\gamma$  y la producción de NO en la línea microglial murina BV-2 (Gendron et al., 2003) e induce la liberación de interleuquina-1 $\beta$  tras la liberación de ATP por parte de los astrocitos (Bianco et al., 2005). Por otro lado la activación del receptor P2X4 microglial produce incrementos de la concentración de Ca<sup>+2</sup> y liberación de BDNF que genera un incremento de excitabilidad en neuronas del asta dorsal de la médula espinal generando dolor neuropático (Tsuda et al., 2003).

#### 4.4. IMPLICACIÓN DE LOS RECEPTORES PURINÉRGICOS EN NEURODEGENERACIÓN Y NEUROPROTECCIÓN.

La señalización mediada por nucleótidos extracelulares juega un papel importante en el desarrollo de patologías en el sistema nervioso, tales como trauma e isquemia cerebral, enfermedades neurodegenerativas y desórdenes neuropsiquiátricos, como la esquizofrenia y la epilepsia y dolor neuropático (Burnstock, 2008; Burnstock et al., 2011b). En esta sección desarrollaremos más concretamente el papel de los receptores purinérgicos en las patologías asociadas a procesos neurodegenerativos del sistema nervioso y a los procesos de neuroprotección asociados.

El daño celular producido durante los procesos de **isquemia, trauma (cerebral y medular) o apoplejía**, genera una liberación masiva de ATP al medio extracelular (Franke et al., 2006a; Melani et al., 2006; Melani et al., 2005; Wang et al., 2004), que desencadena cascadas de señalización celular que agravan el daño neuronal y glial producido, aunque en ocasiones, sirven como mecanismos protectores (Franke et al., 2006b; Majumder et al., 2007). Tras el daño se produce la activación de la microglía, seguida de la proliferación de astrocitos generando gliosis reactiva y la desmielinización generada por la muerte de oligodendrocitos (Abbracchio and Burnstock, 1998; Neary et al., 2006). Junto con el ATP, también se libera glutamato en las zonas de daño (Sperlagh et al., 2007), que genera excitotoxicidad causando la muerte de neuronas y células gliales en la zona de penumbra adyacente. Sin embargo, el ATP puede activar receptores P2, entre ellos el P2X7, para

estimular la liberación de GABA, y proteger de dicha excitotoxicidad (Inoue, 1998; Pannicke et al., 2000; Wang et al., 2002). El receptor P2X7 se ha descrito como el principal desencadenante del daño mediado por ATP en estos procesos, expresándose en neuronas, astrocitos, microglía y oligodendrocitos. Actualmente, se estudia la utilización de antagonistas de este receptor como posible tratamiento, principalmente el *Brilliant Blue G* (BBG). En procesos de daño medular y cerebral generado en ratón, se ha observado que el BBG genera mejoras en las capacidades motoras y una recuperación del tejido dañado (Kimbler et al., 2012; Peng et al., 2009). Asimismo, este mismo tratamiento reduce la excitotoxicidad neuronal y reduce el daño cerebral en ratones a los que se les ha realizado una oclusión de la arteria medial cerebral (MCAO), generando una isquemia focal (Arbeloa et al., 2012).

La liberación de ATP puede incrementar la inflamación crónica observada en la **enfermedad de Alzheimer**. Dicha inflamación es debida a metabolismo anormal de la proteína precursora amiloide (APP) en neuronas de la corteza cerebral, que se proteoliza por  $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasas generando péptido  $\beta$ -amiloide, presente en las placas amieloides. El receptor P2X7 está altamente expresado en el cerebro de pacientes con Alzheimer y en modelos animales (McLarnon et al., 2006; Parvathenani et al., 2003), aumentando las lesiones degenerativas a través de su activación en macrófagos y microglía (Rampe et al., 2004). Recientemente se ha observado que su inhibición reduce el número de placas amieloides (Díaz-Hernández et al., 2012) y que puede tener efectos beneficiosos estimulando la vía de procesamiento de APP no amiloidogénica a través de  $\alpha$ -secretasas (Delarasse et al., 2011). En cuanto a otros receptores, el receptor P2Y1 se expresa en estructuras características de esta enfermedad, como los ovillos neurofibrilares y placas neuríticas (Moore et al., 2000b) y el P2Y2 puede generar efectos neuroprotectores (Leon-Otegui et al., 2011).

La **enfermedad de Huntington** se caracteriza por una progresiva neurodegeneración estriatal. La mutación responsable es una repetición CAG anormal, expandida e inestable en la región codificante de la proteína huntingtina. Se ha descrito que la expresión del receptor P2X7 está alterada en neuronas afectadas, promoviendo un aumento de la apoptosis. Por el contrario, la inhibición in vivo de este receptor, con antagonista BBG, previene la apoptosis neuronal y atenúa los déficits motores y de coordinación en los individuos enfermos (Díaz-Hernández et al., 2009).

Finalmente, la **esclerosis lateral amiotrófica (ELA)** causa la degeneración de las neuronas motoras en la corteza motora, el tallo cerebral y la médula espinal, que resulta en una progresiva atrofia y debilidad de los músculos, seguida de parálisis y muerte temprana. En el modelo transgénico para ELA se ha observado una sobre-expresión de los receptores P2X4, P2X7 y P2Y6 en células de microglía (D'Ambrosi et al., 2009). Asimismo, se ha descrito que la activación del receptor P2X7 en astrocitos de la médula espinal promueve la muerte de motoneuronas, mientras que su inhibición reduce la neuroinflamación en un modelo de ELA (Gandelman et al., 2010). Bajas concentraciones de ATP y de ivermectina, que activan P2X4, tienen efectos protectores en las motoneuronas, mientras que altas concentraciones de ATP (activación del receptor P2X7) generan el efecto contrario (Andries et al., 2007; Casanovas et al., 2008).

## 5. EL RECEPTOR P2X7.

El receptor P2X7 fue originalmente clonado a partir de cerebro de rata, pero a pesar de ello, se estableció que este receptor se expresaba predominantemente en células inmunes presentadoras de antígeno y epitelio, pero no en neuronas, y que funcionaba como un receptor inmunomodulador (Collo et al., 1997; Surprenant et al., 1996). A raíz de estos datos, multitud de estudios confirman que este receptor regula diferentes aspectos de la función inmune en células inmunocompetentes (Di Virgilio et al., 2001). Sin embargo, en los últimos

años, el estudio de la implicación de este receptor en las funciones del sistema nervioso ha tomado un gran protagonismo, de ahí que nuestro estudio se centre, entre otros, en este receptor P2X.

### 5.1. ESTRUCTURA MOLECULAR Y SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR.

Aunque presenta una gran homología con el resto de subunidades P2X, presenta características diferenciales en cuanto a su modo de señalización y estructura molecular. La activación del receptor P2X7 mediante la unión de ATP, no sólo supone un incremento de la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular; a diferencia del resto de subunidades, una exposición prolongada o repetida del agonista supone la apertura de un poro en la membrana, permeable a moléculas de alto peso molecular e iones por encima de 800 Da (Surprenant et al., 1996). La formación del poro produce la aparición de daño en la membrana y en algunos casos la apoptosis celular (Virginio et al., 1999).

En cuanto a su estructura molecular (**Fig. 18**), presenta un dominio carboxi-terminal mucho más largo que resto de subunidades, con más de 200 aminoácidos y un dominio hidrofóbico extra. Este extremo C-terminal es responsable de la translocación del receptor a la superficie celular, gracias a un dominio específico de transporte a la membrana (Smart et al., 2003; Wiley et al., 2003) y se describió que era necesario para la formación del poro en la membrana anteriormente descrito (Adriouch et al., 2002; Surprenant et al., 1996). Estudios posteriores describen que el poro se forma por la acción de una proteína relacionada con la familia de las panexinas con la que el receptor P2X7 interacciona, de forma directa o indirecta tras su activación (Locovei et al., 2007). Finalmente, se ha estudiado que este dominio carboxi-terminal forma un complejo con once proteínas, principalmente componentes del citoesqueleto, entre las que destacan  $\alpha$ -actinina, supervillina y  $\beta$ -actina por su implicación en la regulación de la dinámica del citoesqueleto de actina, fundamental para el desarrollo neuronal (Kim et al., 2001). El receptor P2X7 puede formar homo- o hetero-trímeros junto con el receptor P2X4 (Jarvis and Khakh, 2009).

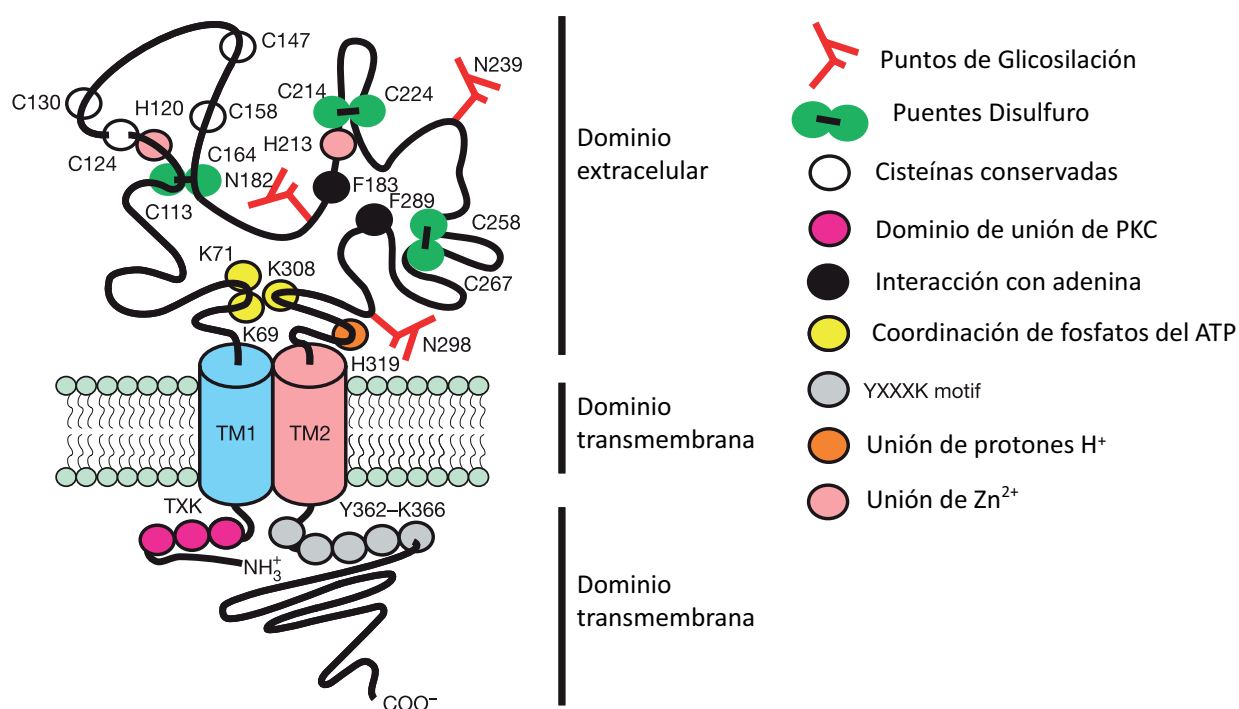


Fig.18 Estructura molecular del receptor P2X7.

## 5.2. REGULACIÓN FARMACOLÓGICA.

En cuanto a su regulación farmacológica, está ampliamente descrito que el receptor P2X7 requiere concentraciones inusualmente altas de ATP ( $>100\ \mu\text{M}$ ) para su activación y no muestra desensibilización tras varios segundos, e incluso minutos en presencia del agonista (Gever et al., 2006; North, 2002). Otro agonista utilizado es el 2',3'-O-(4-benzoil-benzoil)adenosin-5'-trifosfato (BzATP), es 10-30 veces más potente que el ATP para el receptor P2X7, aunque puede unirse a los receptores P2X1, P2X2 y P2X3 con la misma afinidad (Bianchi et al., 1999). Sin embargo, la corriente de iones que fluye a través del receptor es inhibida por cationes divalentes  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$  y el pH bajo, de hecho, en estudios muy tempranos ya se observó que la máxima respuesta al ATP se obtenía en ausencia de  $\text{Mg}^{+2}$  (Cockcroft and Gomperts, 1980). Finalmente el receptor P2X7 tiene varios antagonistas, el más utilizado es el Brilliant Blue G (BBG), un antagonista no competitivo que es selectivo para P2X7 en el rango de nanomolar ( $\text{IC}_{50} = 10\ \text{nM}$ ) (Jiang et al., 2000); a una concentración de 100 nM bloquea completamente las corrientes sinápticas mediadas por ATP en receptores P2X7 recombinantes de rata (Hibell et al., 2000). Otro antagonista muy utilizado es el ATP oxidado con peryodato (oxo-ATP), que es un antagonista irreversible muy utilizado para identificar las funciones del receptor P2X7 en sistema inmune (Murgia et al., 1993), sin embargo, se ha descrito que interfiere con procesos inflamatorios independientemente a la activación del receptor P2X7 (Beigi et al., 2003; Di Virgilio, 2003). Otro antagonista muy utilizado es el KN-62, es un antagonista selectivo no competitivo de P2X7 ( $\text{IC}_{50} = 15\ \text{nM}$ ), también conocido como inhibidor de CAM-kinasa II ( $\text{IC}_{50} = 0.9\ \mu\text{M}$ ).

## 5.3. LOCALIZACIÓN EN EL SISTEMA NERVIOSO.

Estudios de hibridación *in situ* permiten localizar al receptor P2X7 en diversas áreas del sistema nervioso central, tales como la médula espinal, médula oblongada, cerebelo, estriado, tálamo, amígdala e hipocampo, preferentemente en los terminales presinápticos (Deuchars et al., 2001; Yu et al., 2008). A pesar de que se postuló que el receptor P2X7 estaba ausente en neuronas (Collo et al., 1997); experimentos de RT-PCR desvelan que su ARN mensajero se expresa en neuronas tanto centrales como periféricas del sistema nervioso (Hervas et al., 2003; Yu et al., 2008).

## 6. LOS RECEPTORES P2Y1 Y P2Y13.

El ADP extracelular, producto de degradación del ATP, activa principalmente tres receptores P2 metabotrópicos, P2Y1, P2Y12 y P2Y13. En nuestro estudio nos hemos centrado en los receptores P2Y1 y P2Y13, puesto que se expresan en neuronas de hipocampo (Csolle et al., 2008), mientras que el receptor P2Y12 se expresa en tronco cerebral, en neuronas ganglionares de la raíz dorsal (Heinrich et al., 2008) y en oligodendrocitos, pero no está presente en neuronas hipocámpales o neocorticales (Amadio et al., 2006; Hollopeter et al., 2001).

### 6.1. ESTRUCTURA MOLECULAR Y SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR.

En cuanto a su estructura molecular, ambos son receptores de siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G. En estudios de mutagénesis dirigida se ha observado que el receptor P2Y1 forma un dominio de unión en el que los residuos de las regiones transmembrana 3, 6 y 7 son determinantes para la unión de los nucleótidos (Jiang et al., 1997; Moro et al., 1998). Asimismo, se han descrito cuatro residuos de cisteína

conservados en los bucles extracelulares que son esenciales para el tráfico del receptor P2Y1 humano a la superficie celular (Hoffmann et al., 1999).

En cuanto a su señalización intracelular, el receptor P2Y1 activa proteína  $G\alpha_{q/11}$  generando un incremento de los niveles intracelulares de  $IP_3$  y la liberación de calcio intracelular desde los reservorios intracelulares (Waldo and Harden, 2004). Estos procesos inducen la activación de la proteína quinasa C (PKC) y cascadas de señalización secundarias, entre las que destacan la activación de fosfolipasa C específica de fosfatidilcolina, que prolonga la activación de PKC (Purkiss and Boarder, 1992); la activación de la fosfolipasa A2 y la generación de ácido araquidónico y sus metabolitos (Mateo et al., 1996); la activación de la enzima óxido nítrico sintetasa y la generación de óxido nítrico (NO) (Kunapuli and Daniel, 1998) y finalmente la activación de MAPK y la inhibición de GSK3 dependiente de PKC en astrocitos (Delicado et al., 2005; Neary and Kang, 2006). Por el contrario, el receptor P2Y13 se acopla a proteína  $G_{i/o}$  inhibiendo la formación de AMPc. Asimismo, se ha observado que el receptor P2Y13 también puede unirse a proteína  $G_s$  en presencia de altas concentraciones de ADP, promoviendo un incremento de la síntesis de AMPc (Communi et al., 2001).

## 6.2. REGULACIÓN FARMACOLÓGICA.

En cuanto a la farmacología de estos receptores, ambos son activados por ADP aunque el ATP también actúa como agonista parcial con menor afinidad (Marteau et al., 2003; Palmer et al., 1998). En el caso del **receptor P2Y1**, el derivado del ADP, 2-MeSADP también actúa como agonista siendo su efecto más potente que el del propio ADP. El orden de afinidad de agonistas para el receptor P2Y1 sería el siguiente: 2-MeSADP > ADP > ATP (Waldo and Harden, 2004). En cuanto a sus antagonistas principales se han descrito el MRS-2179, agonista selectivo no competitivo ( $IC_{50} = 1.15 \mu M$ ), activa otros receptores P2Y pero con menor afinidad (Boyer et al., 1998; Camaioni et al., 1998) y el MRS-2279, antagonista selectivo competitivo ( $IC_{50} = 51.6 nM$ ) (Boyer et al., 2002). Ambos antagonistas bloquean el receptor con la misma afinidad (Waldo and Harden, 2004).

En el caso del **receptor P2Y13**, además de ADP tiene como agonista natural el Ap3A (Zhang et al., 2002), el 2-MeSADP también puede actuar como agonista con una potencia mayor o igual a la del ADP, en función de las condiciones experimentales (Marteau et al., 2003), por tanto, el orden de afinidad sería el siguiente: 2-MeSADP ( $EC_{50} = 19 nM$ )  $\geq$  ADP ( $EC_{50} = 60 nM$ ) > Ap3A ( $EC_{50} = 72 nM$ ) > ATP ( $EC_{50} = 261 nM$ ) (Zhang et al., 2002). En cuanto a los antagonistas, el cangrelor y el clopidogrel, antagonistas del receptor P2Y12 se ha visto que también bloquean el receptor P2Y13 y más recientemente, el MRS-2211 se ha descrito como antagonista competitivo específico de este receptor ( $pIC_{50} = 5.97$ ) (Kim et al., 2005).

## 6.3. LOCALIZACIÓN EN EL SISTEMA NERVIOSO.

En cuanto a su localización, estos receptores están ampliamente distribuidos por el sistema nervioso. La expresión del ARN mensajero del receptor P2Y1 ha sido localizada en corteza, cerebelo, hipocampo y globo pálido, así como en regiones de los ganglios basales, incluyendo el estriado, núcleo *acumbens*, núcleo caudado y putamen. Tinciones inmunohistoquímicas en secciones de cerebro humano han confirmado una localización principalmente neuronal para el receptor P2Y1 (Moore et al., 2000a). En el caso del receptor P2Y13, su ARN mensajero se ha localizado en cerebelo, hipocampo, tálamo, sustancia nigra o núcleo caudado (Communi et al., 2001).



## ***Objetivos***

---

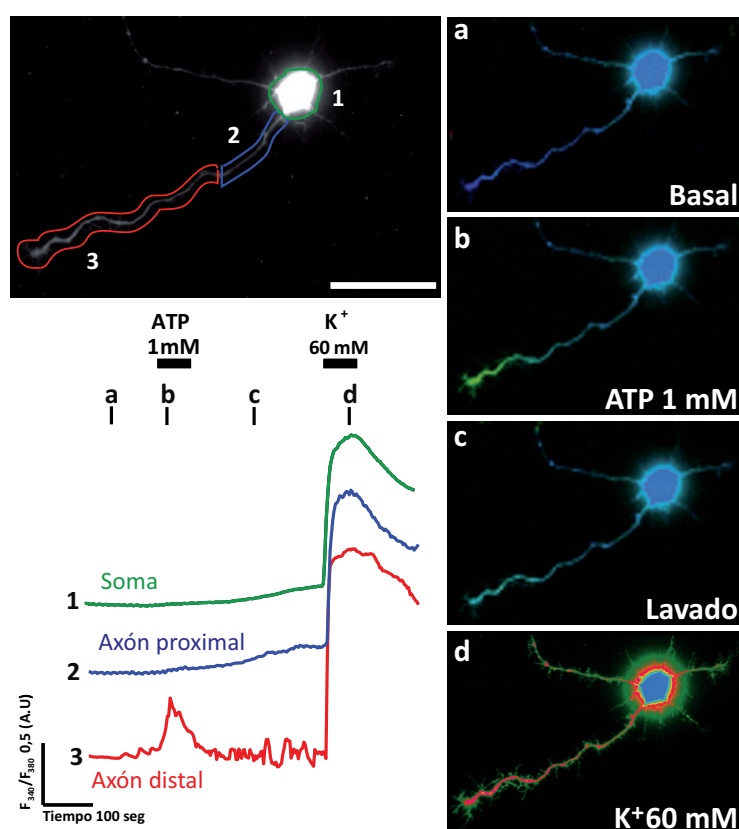




Como se ha descrito en el apartado anterior, el sistema purinérgico juega un importante papel en la modulación del desarrollo del sistema nervioso, en la comunicación neurona-glia, así como en enfermedades del sistema nervioso. Sin embargo, el conocimiento que se tiene sobre la función de estos receptores y ligandos es muy limitado, en cuanto se refiere a la morfología y función del axón. El objetivo general de este trabajo experimental ha sido caracterizar el papel de nucleótidos de adenina, ATP y ADP, y sus receptores en el desarrollo y maduración del axón. Para ello, el trabajo se ha centrado en las etapas iniciales de elongación axonal y en la posterior regulación del segmento inicial del axón (lugar de generación del potencial de acción).

Un experimento previo a la realización de este trabajo mostró que el incremento de ATP (+ 1 mM) inducía un aumento de la concentración de calcio intracelular en la región distal del axón de neuronas de hipocampo en cultivo en fases tempranas del desarrollo (**Fig. O1**).

Ello nos condujo a plantearnos estudiar el papel de las purinas y sus receptores en el control de la elongación axonal y su posterior influencia en la funcionalidad de dominios axonales.



**Fig. O1. El ATP produce un incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  en la zona más distal del axón en neuronas hipocámpales.** En la imagen se muestra la señal de fluorescencia de una neurona cargada con la sonda Fura-2AM, en la que se analizaron las variaciones de la concentración de calcio en tres áreas diferentes nombradas de 1 a 3. Se representan los cambios de fluorescencia de la sonda Fura-2AM a lo largo del tiempo en las áreas seleccionadas. Las líneas representan la relación entre las longitudes de onda 340/380 nm. Las neuronas fueron estimuladas con ATP (+ 1 mM). Las barras sólidas indican el periodo de estimulación. Para comprobar la viabilidad de las neuronas al final del experimento se estimularon con un pulso de KCl (60 mM).

**Objetivo 1:** Caracterización del papel de las purinas y sus receptores en la elongación axonal en un modelo de neuronas de hipocampo en cultivo.

- a) Estudio de los efectos del ATP y ADP extracelulares en la elongación axonal.
- b) Caracterización de la expresión de los receptores P2X y P2Y relacionados con estas purinas en neuronas de hipocampo, e identificación de la función de cada uno de ellos.
- c) Análisis de las vías de señalización controladas por estos receptores, así como su posible coordinación.

**Objetivo 2:** Análisis del papel del ATP en el control de la excitabilidad neuronal y regulación de la integridad del SIA en condiciones patológicas.

Dado que en condiciones patológicas se produce una importante liberación de ATP al medio extracelular que puede dañar neuronas o cambiar su funcionalidad, nos planteamos:

**a)** Estudiar del papel del ATP en la modulación de la concentración de canales iónicos en el SIA y la posible implicación del receptor P2X7.

**b)** Análisis del posible papel de este receptor en la protección del SIA en un modelo de isquemia cerebral transitoria en rata.

## ***Materiales y Métodos***

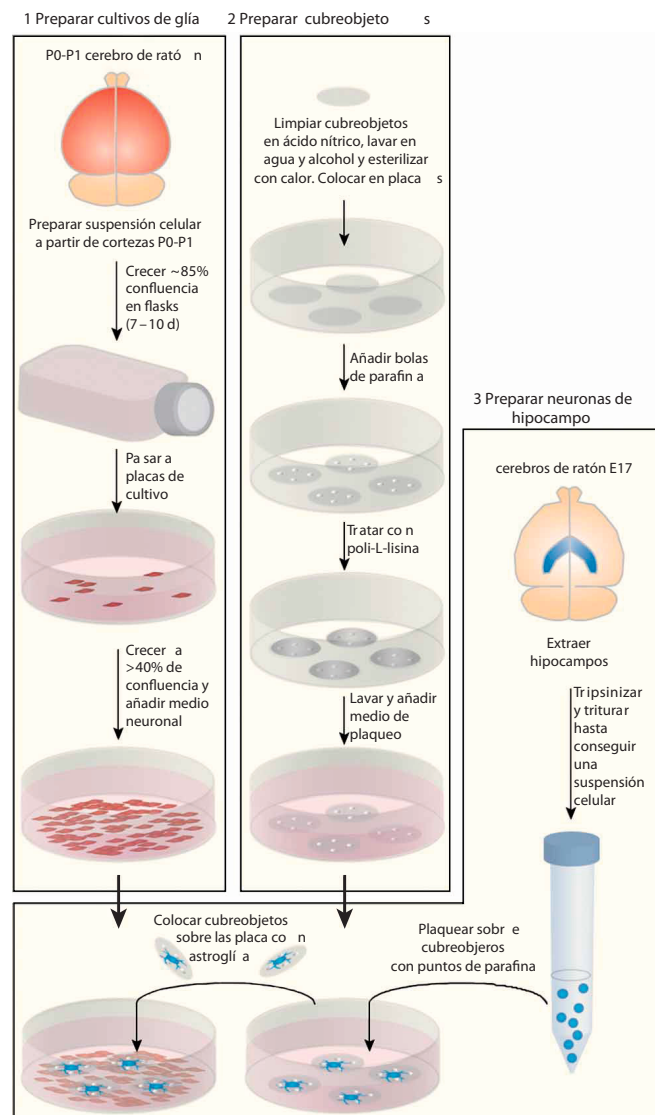
---



## 1. CULTIVOS CELULARES

### 1.1 Cultivo primario de neuronas de hipocampo.

Los cultivos primarios de neuronas de hipocampo se prepararon como ha sido descrito previamente (Goslin and Banker, 1989; Kaech and Banker, 2006). En resumen, los hipocampos se obtuvieron de embriones de ratón (cepa Swiss CD1) de 17 días y se lavaron varias veces con medio HBSS libre de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ . El tejido fue digerido con tripsina (GIBCO) al 0.25%, durante 15 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  y a continuación se disoció y resuspendió en medio de plaqueo (MEM, suero de caballo 10% y glucosa 0.6%). Las células disociadas se plaquearon en cubreobjetos tratados previamente con poli-L-lisina 1mg/ml (Sigma) a una densidad de 7500 células/ $\text{cm}^2$ . Tras 3 horas de incubación, para permitir la adhesión neuronal al sustrato, se realizó un cambio de medio, añadiendo medio neuronal (Neurobasal suplementado con B27 y Glutamax-1 (GIBCO, Invitrogen) y antibióticos). En el caso de co-cultivo de neuronas de hipocampo con astrocitos a largo plazo ( $> 7$  DIV) a los cubreobjetos se fijaron 3 ó 4 puntos equidistantes de parafina, que se invirtieron sobre las placas que contenían los astrocitos. Estas placas con astrocitos fueron cambiadas a medio neuronal 24 horas antes. Después de 3 días de diferenciación in vitro, los cultivos fueron suplementados con AraC (1- $\beta$ -D-arabinofuranosilcytosina, 5  $\mu\text{M}$ ) para prevenir la división y proliferación glial. Para realizar pruebas bioquímicas, neuronas de hipocampo fueron plaquedas en



**Figura M1. Esquema del proceso de elaboración de un cocultivo primario de neuronas de hipocampo sobre astrocitos.** Imagen adaptada de Kaech and Banker, 2006.

placas previamente tratadas con poly-L-lisina (0.5 mg/ml) a una densidad de  $1 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>.

## 1.2 Cultivo de astrocitos

Para el cultivo de neuronas a largo plazo (> 7 DIV) se cultivaron las neuronas hipocampales en presencia de una monocapa de astrocitos, lo que permite la difusión de factores solubles sin contacto directo entre las diferentes células. Los cultivos primarios de astrocitos se prepararon como se ha descrito previamente (Kaeche and Banker, 2006). Las cortezas obtenidas de la disección de ratones postnatales P0-P1 se lavaron y digirieron con tripsina (GIBCO) al 0.25%, en presencia de DNAsa-I (1 mg/ml, Roche) durante 15 minutos a 37°C. A continuación se trituró el tejido en medio glial (MEM, suero de caballo 10%, glucosa 0.6%, penicilina-estreptomicina, anfotericina B y Glutamax-1), se filtró empleando un filtro de Nylon (70 µm de poro) y se centrifugó durante 10' a 1000 rpm. Tras resuspender en medio glial, las células fueron plaqueadas en flask a una densidad de  $7.5 \times 10^6$  células por flask. Después de 1 semana de incubación, se cambió el medio y cuando los astrocitos llegaron a confluencia, tras repetidos cambios de medio, se tripsinizaron y se plaquearon a una densidad de  $10^5$  células en placas de cultivo de 60 mm de diámetro.

## 1.3 Cultivo de células HEK293T y transfección.

Células HEK-293T se mantuvieron en DMEM (Gibco) suplementado con 10% (v/v) suero fetal de ternero (FBS). Las células fueron resuspendidas 1 día antes de la transfección y plaqueadas a una densidad de 105 células/cm<sup>2</sup> y fueron mantenidas en medio con 0.5% (FBS). Estas células, HEK-293T, fueron transfectadas con Lipofectamina 2000 (invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

## 1.4 Cultivo organotípico de cerebro de rata.

Rodajas de cerebro con las regiones del hipocampo y la corteza entorrinal se obtuvieron a partir de ratones postnatales de 8 días como se describe previamente (Debanne et al., 2008). Mediante el uso de un vibrátomo (Leica VT 1000S) se realizaron secciones de 300 ó 350 µm, manteniendo el tejido en una solución compuesta por sacarosa 280 mM, NaHCO<sub>3</sub> 26 mM, KCl 1.3 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, D-glucosa 11 mM, rojo fenol 50 mM y kinurenato 2 mM. Las secciones así obtenidas se mantuvieron durante 1 hora a temperatura ambiente en medio artificial estándar (NaCl 125 mM, KCl 2.5 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.8 mM, NaHCO<sub>3</sub> 26 mM, CaCl<sub>2</sub> 3 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, rojo fenol 50 mM y D-glucosa 11 mM) con oxígeno (95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>). Cada sección o rodaja se depositó sobre una membrana de látex (Millicel, Millipore) y después, se introdujo en una placa de Petri de 35mm con 1 ml de medio de cultivo (MEM 25 ml, HBSS 12.5 ml, suero de caballo 12.5 ml, penicilina-estreptomicina 0.5 ml, solución de glucosa 0,8ml (1 M), solución de ácido ascórbico 0.1 ml (1 mg/ml), HEPES 0.4 ml (1 M), B27 0.5 ml y agua 8.95 ml). Las secciones se incubaron a 34°C (95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>) durante 1-2 días antes de tratarlas (1 día) o transfectarlas (2 días). Después de 1 día in vitro los cultivos organotípicos fueron suplementados con AraC (5 µM) y se mantuvieron hasta 4-5 días in vitro para su registro electrofisiológico o fijación.

## 2. TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS

Los compuestos farmacológicos empleados, sus características así como la concentración utilizada se detallan en la tabla M1. Los tiempos de tratamiento se especifican en cada experimento.

Compuesto	Sustrato	Efecto	Uso	Origen
2meSADP	Receptores purinérgicos P2Y	Agonista	10 $\mu$ M	Sigma Aldrich #M152
A-438079	Receptor P2X7	Antagonista competitivo	200 nM	Tocris #2972
ADP	Receptores purinérgicos P2Y	Agonista	5-10 $\mu$ M	Sigma Aldrich #A2754
AR-A04418	GSK3 $\alpha\beta$	Inhibición ATP-competitiva	20 $\mu$ M	Calbiochem #361549
ATP	Receptores purinérgicos P2	Agonista	1mM	Sigma Aldrich #A5394
Brilliant Blue G (BBG)	Receptor P2X7	Antagonista selectivo	0,1-5 $\mu$ M	Sigma Aldrich #B0770
Bz-ATP	Receptor P2X7	Agonista selectivo	200 $\mu$ M	Sigma Aldrich #B6396
Calpeptina	Calpaina	Inhibidor	10 $\mu$ M	Calbiochem #03340051
cAMPS-Rp	PKA	Análogo de AMPc, antagonista competitivo de la activación de PKA por AMPc	20 $\mu$ M	Tocris #1337
db-AMPC	-	Análogo de AMPc	5 $\mu$ M	Sigma #D0627
EGTA	Calcio	Quelante	2 mM	Sigma Aldrich #E3889
Forskolina	Adenilato ciclasa	Activador	5 $\mu$ M	Sigma Aldrich #F6886
Gö-6976	PKCs clásicas	Inhibidor selectivo		Tocris #2253
H89	PKA	Inhibidor selectivo	5 $\mu$ M	Sigma Aldrich #B1427
Ip5I	Receptores P2X1 y P2X3	Antagonista	1 $\mu$ M	Cedido por M. Teresa Miras-Portugal (Pintor et al., 1997).
KN-62	P2X7	Antagonista no competitivo	50 nM	Tocris #1277
LY-294002	PI3K	Inhibidor reversible	50 $\mu$ M	Calbiochem #440202
MDL-28170	Calpaína	Inhibidor selectivo	50 nM	Tocris #1146
MRS-2179	Receptor P2Y1	Antagonista competitivo	0,5-1 $\mu$ M	Tocris #0900
MRS-2211	Receptor P2Y13	Antagonista competitivo	1-10 $\mu$ M	Tocris #2402
NKY80	Adenilato ciclasa V	Inhibidor selectivo	10 $\mu$ M	Sigma Aldrich #N2165
PDE4 inhibidor	Fosfodiesterasa 4B y 4D	Inhibidor de alta afinidad	20 nM	Calbiochem #524717
PPADS	Receptores P2	Antagonista	30 $\mu$ M	Sigma Aldrich #P178
rPMT	Proteínas G <sub>q</sub>	Activador	20 ng	Calbiochem #512743
SQ-22536	Adenilato ciclasa	Inhibidor	20 $\mu$ M	Calbiochem #568500
Toxina Pertúsica	Proteínas G <sub>i</sub>	Desacopla proteína G <sub>i</sub> del receptor	100 ng	Biomol #G100-0050
U-73122	Fosfolipasa C	Inhibidor	20 ng	Calbiochem #662035

Tabla M1. Tratamientos farmacológicos.

### 3. PLÁSMIDOS

Los plásmidos utilizados se resumen en la tabla M2, y fueron amplificados en condiciones estándar (medios LB, 37°C y agitación), en la bacteria *Escherichia coli* (cepa DH5α). A partir de estos cultivos, se purificaron los plásmidos mediante el kit *HiSpeed Plasmid Maxi Kit* (QIAGEN). Una vez obtenidos los plásmidos, se comprobó la naturaleza de cada plásmido mediante una digestión analítica con enzimas de restricción y comprobación en geles de agarosa con tinción de *SyBr Green* o *Gel Red*. Se cuantificó la concentración y pureza del ADN en el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (*Thermo Scientific*). Finalmente, se realizaron transfecciones transitorias de los plásmidos en células HEK293T seguida de una cuantificación mediante Western-blot para determinar su eficiencia.

Plasmido	Contenido	Procedencia
ICUE3	Biosensor de AMPc	Cedido por Dra. Jin Zhang (DiPilato and Zhang, 2009)
pd2EGFP-N1	Secuencia P2X7 (cDNA) (número de clon: MGC: 20089)	Cedido por Dra. Maria Teresa Miras Portugal
pSUPER-neo-GFP	shRNA de P2X7	Cedido por Dra. Maria Teresa Miras Portugal
pEGFP-N1	Proteína GFP ("enhanced")	Clontech
pSUPER-neo-GFP	Secuencia control ("scramble") para los interferentes	Cedido por Dra. Maria Teresa Miras Portugal
pEGFP-N1	Secuencia P2Y1 (cDNA) (Numero de clon: MGC: BC074784)	Cedido por Dra. Maria Teresa Miras Portugal
pcDNA3	Secuencia P2Y13 (cDNA) (Numero de clon: BC041116)	Cedido por Dra. Maria Teresa Miras Portugal
pSUPER-neo-GFP	shRNA de P2Y1	Cedido por Dra. Maria Teresa Miras Portugal
pSUPER-neo-GFP	shRNA de P2Y13	Cedido por Dra. Maria Teresa Miras Portugal
Scramble shRNA pGFP-V-RS	Secuencia control ("scramble") interferentes	Origene #TR30007
ADCY5 shRNA pGFP-V-RS	shRNAs de Adenilato Ciclasa V	Origene #TG506651

Tabla M2. Plásmidos.

### 4. ELECTROPORACIÓN (NUCLEOFECCIÓN) DE NEURONAS DE HIPOCAMPO

Para la introducción de plásmidos en neuronas de hipocampo se utilizó el sistema Nucleofector II (AMAXA BIOSYSTEMS), con el que se obtiene una buena eficiencia de transfección, alrededor del 15%. Siguiendo los consejos de la casa comercial (Amaza) las células en suspensión se centrifugaron a 80xg durante 3 minutos, y se resuspendieron en el tampón de nucleofección específico (*Mouse Neuron Nucleofector Kit*, AMAXA BIOSYSTEM). Por cada nucleofección se empleó un número de neuronas de entre 0.5-3x10<sup>6</sup> con una cantidad total de 3 µg de ADN. En el caso de co-transfecciones con plásmido pEGFP-N1 se empleó una mezcla en proporción 1/6 (plásmido de interés/pEGFP-N1). Después de la electroporación las células se plaquearon y



cultivaron según el protocolo que se ha descrito previamente.

## 5. INTRODUCCIÓN DE PLÁSMIDOS DE EXPRESIÓN MEDIANTE GENE GUN

Para la introducción de plásmidos en neuronas de rodajas de cerebro se utilizó el sistema Helyos Gene Gun (Biorad) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este sistema permite crear una corriente de helio de gran velocidad que consigue acelerar, hasta velocidades óptimas, partículas de oro recubiertas de plásmidos para la penetración y transformación posterior de células *in vivo* e *in vitro*. En primer lugar se prepararon cartuchos con micropartículas de oro recubiertas con el ADN plasmídico (P2X7-GFP, GFP) según las instrucciones de BioRad, y tras introducirlos en un soporte especial se dispararon sobre secciones de 2 días *in vitro* a una presión de helio de 120 psi (*pounds per square inch*, libra por pulgada cuadrada). Las secciones se mantuvieron en incubación durante 1-2 días más para permitir la expresión de los receptores P2X7 antes de proceder a su registro electrofisiológico.

## 6. INMUNOCITOQUÍMICA Y CUANTIFICACION.

Para estudiar la localización de la expresión de determinadas proteínas por inmunocitoquímica fijamos las neuronas hipocampales cultivadas a baja densidad con PFA 4 % durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de tres lavados con PBS 1X, dichas neuronas se incubaron en  $\text{NH}_4\text{Cl}$  50 mM durante 30', para eliminar la posible señal de autofluorescencia. Posteriormente, mediante una incubación de 1 hora con tampón PGT (PBS, gelatina 0.22 % (*Gelatin from cold water fish skin*, Sigma) y Tritón X-100 0.1 %) se bloquearon uniones inespecíficas y al mismo tiempo se permeabilizó la membrana plasmática de las neuronas. A continuación, se incubaron con los anticuerpos primarios (tabla M3) diluidos en PGT durante 1h a temperatura ambiente y, tras lavados en flujo continuo con la solución de bloqueo, se incubaron los correspondientes anticuerpos secundarios Alexa fluor-488 (emisión en verde), 555-594 (emisión en rojo) o 647 (emisión en rojo lejano y posterior conversión a azul) (1/1000, Invitrogen). Para ver la disposición de F-actina polimerizada se utilizó Faloidina acoplada a Alexa 594 (1/100, Invitrogen). Los cubreobjetos se montaron sobre *Fluoromount G* (Southern Biotechnology Associates, Inc.) al finalizar las incubaciones y los lavados del anticuerpo secundario.

Las imágenes de microscopía confocal se obtuvieron principalmente utilizando un microscopio de barrido confocal LSM 510 acoplado a un microscopio invertido Axiovert200 M (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania) realizando un stack (número de planos focales por conjunto de planos) de número variable dependiendo del tamaño celular. Finalmente todas las imágenes fueron procesadas con el software Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems Incorporated, San José, California, EEUU). Las cuantificaciones de longitud axonal se midieron con la aplicación *Neuron J (Image J)* así como la intensidad de fluorescencia en axones. La cuantificación de fluorescencia en segmentos iniciales fue medida con la aplicación de MatLab "ais\_z3.m", desarrollada por el laboratorio de Mathew Grubb (*MRC Centre for Developmental Neurobiology King's College London*). Se llevaron a cabo tres réplicas de cada experimento y tras contabilizar un mínimo de 30 o 100 neuronas por condición experimental, se analizó su grado de significación estadística mediante el test t de Student o ANOVA (programa SigmaPlot.11).

Anticuerpo	Clase	PM (KDa)	Dilución	Origen
$\alpha$ tubulina	Monoclonal Raton	50	IC: 1/1000 WB: 1/5000	Sigma Aldrich #T6199
$\alpha$ -tubulina tirosinada (Clon TUB 1A2)	Monoclonal Raton	50	IC: 1/1000	Sigma Aldrich #T9028
AKT1/2/3	Policlonal Conejo	60	WB: 1/1000	Santa Cruz #sc-8312
AKT fosforilado (S473)	Policlonal Conejo	60	WB: 1/1000	Cell Signaling #9271
AnkirinaG Clon (N106/36)	Monoclonal Ratón	270	IC: 1/200 IH: 1/100	Neuromab #75-146
$\beta$ IV- espectrina	Policlonal Ratón	288	IH: 1/500	Cedido por el Dr. Mathew Rasband
$\beta$ -actina	Monoclonal Ratón	42	WB 1/1000	Sigma Aldrich #A2228
Canal de Sodio (Clon K58/35)	Monoclonal Ratón	260	IC: 1/100	Sigma Aldrich #S8809
GAPDH	Policlonal Conejo	35	WB: 1/1000	Cell signaling #2118
GSK3 $\alpha\beta$	Monoclonal Ratón	50	WB: 1/1000	Biosource #44-610
GSK3ab fosforilado (Ser9/21)	Policlonal Conejo	50	WB: 1/1000	Cell signaling #9331
MAP2	Policlonal Conejo	200	IC: 1/1000	Millipore #ab5622
MAP2	Policlonal Pollo	200	IC: 1/10000	AbCAM #ab5392
P2X7 receptor	Policlonal Conejo	68	IC: 1/100	Alomone #APR-004
P2X7 receptor	Policlonal Conejo	68	IC: 1/100 WB: 1/500	abCAM #ab77413
P2Y1 receptor	Policlonal Conejo	63	IC: 1/100 WB: 1/500	Alomone #APR-009
P2Y13 receptor	Policlonal Conejo	41	IC: 1/100 WB: 1/500	Alomone #APR-017
Tau-1 (Clon PC1C6)	Monoclonal Ratón	60	IC: 1/1000 WB: 1/1000	Chemicon #MAB3420

**Tabla M3. Anticuerpos primarios.**

### 7. INDUCCIÓN DE ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL TRANSITORIA.

El proceso de isquemia cerebral focal transitoria fue inducido por la oclusión de la arteria cerebral media (MCA) utilizando el método de sutura intraluminal previamente descrito (Longa et al., 1989), con pequeñas modificaciones. Las ratas fueron anestesiadas con isoflurano, acompañado por una inyección subcutánea de atropina (100  $\mu$ g/kg). La arteria carótida común derecha (CCA) fue expuesta y diseccionada, y la arteria carótida externa derecha (ECA) fue aislada. La primera ramificación arterial de la ECA y la arteria pterigopalatina fueron electro-cauterizadas usando un electrocauterizador (*High temperature cautery power handle*, Aaron Medical, Clearwater, USA). Para ocluir el origen de la MCA, se utilizó una sutura de nylon monofilamento Dafilon de 4-0 (B/Braun, Aesculap AG et. Cio., Tuttlingen, Germany), cuyo extremo fue redondeado por calor y posteriormente cubierto con Poly-L-Lysina (0,1% wt/vol en agua deionizada; Sigma, St Louis, MO, USA). La sutura fue introducida a través del lumen de la ECA y se avanzó hasta el interior del lumen de la ICA hasta

que se encontró una resistencia media, aproximadamente 2.2 cm pasada la bifurcación de CCA. La sutura se aseguró y se mantuvo 90 minutos tras la cirugía, pasados los 90' se retiró unos milímetros para permitir de nuevo el flujo sanguíneo y se mantuvo a la rata hasta el sacrificio, 72h después de la cirugía. Las ratas control (Sham) fueron sometidas a los mismos procesos quirúrgicos pero no se introdujo ninguna sutura. Algunas de las ratas operadas fueron tratadas con Brilliant blue G (30mg/kg) tras la retirada de la sutura y posteriormente cada 12h, hasta las 72h tras la cirugía.

## 8. INMUNOHISTOQUÍMICA

Ratas sometidas a experimentos de isquemia fueron perfundidas con PFA al 4 % pH 7.4 preparado en PBS (después de un lavado previo con PBS) y los cerebros fueron mantenidos en PFA 4% 24 horas. Al día siguiente, se inició el proceso de crioprotección pasando los cerebros a sacarosa al 30%. Se dejaron en esta solución hasta que la sacarosa difundió hacia el interior del órgano, observando una pérdida de flotabilidad. Por último, se congelaron los cerebros en OCT (*Optimum Cutting Temperature*; Leica Microsystems GmbH) y se almacenaron a -80°C hasta el momento del corte. Empleando un criostato CM1900 (Leica Microsystems GmbH) se realizaron secciones coronales de 25 µm y adhirieron en portaobjetos (*SuperFrost Plus*, VWR International). Los cortes se permeabilizaron durante 1h en solución de bloqueo (PBS, suero de cabra 10 % (*Goat serum*, Invitrogen) y Tritón X-100 0.5 %). Se incubaron los anticuerpos primarios durante 24 horas a temperatura ambiente y, tras sucesivos lavados con solución de bloqueo, se incubaron los correspondientes anticuerpos secundarios Alexa fluor-488 (emisión en verde) y 555 ó 594 (emisión en rojo). Para la tinción de los núcleos se empleó TO-PRO-3 iodide (642/661) (1/1000 Invitrogen). Después de sucesivos lavados se montaron sobre Fluoromont-G (Southern Biotechnology Associates, Inc.).

Las rodajas de cerebro en cultivo de 350 µm utilizadas para los registros electrofisiológicos fueron fijadas en PFA 4% durante una hora, seguido de tres lavados de 30 min con PBS. Las rodajas se permeabilizaron con una solución de bloqueo (PBS, 20 % suero bovino fetal (FBS) y Tritón X-100 1%) durante 16 horas, posteriormente se incubaron los anticuerpos primarios durante 24h a temperatura ambiente y, tras sucesivos lavados se incubaron con los anticuerpos secundarios descritos anteriormente. Finalmente, tras lavar el anticuerpo secundario se montaron sobre el medio de montaje Fluoromont-G.

## 9. ANALISIS DE PROTEINAS POR ELECTROTRANSFERENCIA E INMUNODETECCIÓN (WESTERN-BLOT).

Las células previamente cultivadas, se lisaron en hielo durante 30 minutos con tampón de lisis (HEPES 200 mM pH 7.4, NaCl 100 mM, NaF 100 mM,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  1 mM, EDTA 5 mM, Tritón X-100 1%, ácido okadaico 1 µM (Calbiochem) e inhibidores de proteasas (Cóctel de inhibidores de proteasas (COMPLETETM Roche Diagnostics)), se añadió tampón de carga *Laemli* (concentración final Tris HCl 125 mM, SDS 4%, Glicerol 10%, β-mercaptoetanol 5% y azul de bromofenol 0.002% (Laemmli et al., 1970)) y se hirvieron a 100 °C durante 5'. Las muestras se conservaron a -20°C hasta su análisis. Posteriormente, se llevó a cabo una electroforesis en gel de acrilamida/SDS (de entre un 8 y un 10% de acrilamida) para separar las proteínas en función de su peso molecular en tampón de electroforesis: tampón Tris 25 mM, glicina 192 mM, 0.1 % SDS, pH 8.3 (Towbin et al., 1979) y un voltaje de 200V. A continuación, se transfirieron las proteínas a un soporte de nitrocelulosa (PROTRAN) en un tampón Tris 25mM, metanol 20% y 0.1% SDS durante 120 minutos a 350 mA. Tanto para la electroforesis de proteínas como para la transferencia se utilizó el sistema *MiniPROTEAN* (BIORAD). Una vez terminada la transferencia de proteínas, las membranas de nitrocelulosa se mantuvieron en agitación en PBT-Tween20 0.2% (PBT), 5% BSA y 5% leche desnatada durante 1h para bloquear las uniones inespecíficas

y posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios (**tabla M3**) durante al menos una noche, a 4°C. Los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente a una dilución de 1/5000 o 1/10000, (Amersham, GE Healthcare). Para la inmunodetección posterior se empleó un sistema de quimioluminiscencia (*Enhanced Chemiluminescence detection system ECL*, Amersham) por exposición y revelado de películas de autorradiografía Amersham. La cuantificación de la densidad óptica se llevó a cabo en un densitómetro modelo GS-710 (Biorad, Life Science Research, CA, USA) con el software *Quantity one*. Los datos obtenidos procedentes de al menos tres ensayos independientes se representaron haciendo la relación de la señal de interés en relación a la obtenida con un anticuerpo del control de carga total de proteína ( $\beta$ -actina o GAPDH), y se analizó su grado de significación estadística mediante un t-test (programa SigmaPlot.11).

## 10. REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS.

Los registros intracelulares de célula completa se obtuvieron de neuronas hipocampales de CA3 o neuronas piramidales corticales (capa V). La solución de registro externa (extracelular) contenía: NaCl 125 mM, NaHCO<sub>3</sub> 26 mM, CaCl<sub>2</sub> 3 mM, KCl 2.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.8 mM y D-glucosa 10 mM, y fue equilibrado con 95 % O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>. Se emplearon electrodos de plata clorurada incluidos en micropipetas de vidrio afilado rellenas con la solución intracelular: gluconato potásico 120 mM, KCl 20 mM, EGTA 0.5 mM, HEPES 10 mM, Na<sub>2</sub>ATP 2 mM, NaGTP 0.3 mM y MgCl<sub>2</sub> 2 mM, pH 7.4. Los registros se llevaron a cabo a 29 °C. Las señales de estimulación y las respuestas de las células se registraron, respectivamente, empleando el programa de ordenador "Clampex", incluido dentro del conjunto de programas pClamp (versión 8 o 10, Axon Instrument). Los registros fueron filtrados contra el paso de bajas frecuencias (3 kHz) y la adquisición de secuencias (500-1500 ms) se realizó a una frecuencia de 0.1 Hz. Las corrientes de sodio fueron evocadas por un pulso de voltaje (50 ms) de -70 mV a 0 mV en *voltage-clamp*. Los componentes capacitivo y de pérdida de la corriente evocada fueron sustraídos con un protocolo convencional P/4. La excitabilidad neuronal intrínseca fue monitoreada con pulsos de corriente de despolarización (1 segundo) de amplitud creciente (de +10/+500 pA) (*current-clamp*).

## 11. ESTUDIOS DE CALCIO INTRACELULAR, ANALISIS MICROFLUORIMETRICO.

Para realizar el análisis microfluorimétrico, las neuronas hipocampales mantenidas en cultivo durante 48-72h, se lavaron con solución HBM (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM glucosa y 10 mM HEPES, pH 7.4) y a continuación se cargaron con una solución que contiene Fura-2AM (5  $\mu$ M) durante 30' a 37 °C. Este periodo de tiempo facilita la hidrólisis intracelular del Fura-2AM. Pasados los 30' los cubreobjetos fueron lavados de nuevo con solución HBM y se montaron en una cámara de perfusión en un microscopio NIKON Eclipse TE-2000. Las neuronas fueron perfundidas continuamente con 1.2 ml/min con solución HBM durante los ensayos funcionales. Pulsos control de 30 segundos con ATP 1 mM se aplicaron a las neuronas; en algunos casos, dichas neuronas fueron pre-incubadas durante 5 minutos con *Brilliant Blue G* (1  $\mu$ M) antes del posterior tratamiento con ATP. Se aplicó un pulso de 60 mM K<sup>+</sup> al final de cada experimento para confirmar la viabilidad de las neuronas en estudio. Las neuronas fueron visualizadas utilizando un microscopio Nikon que contiene un objetivo 40x S Fluor 0.5-1.3 de aceite. La longitud de onda de la luz entrante se filtró a 340 nm y 380 nm con la ayuda de un monocromador (10-nm de ancho de banda, Optoscan monocromador, Cairn). Las imágenes de 12-bits se adquirieron con una cámara CCD ORCA-ER C 47 42-98 de Hamamatsu (Hamamatsu City, Japan) controlada por el programa Metafluor 6,3r6 (Universal imaging, Cambridge, UK). El tiempo de exposición fue 250 ms en cada longitud de onda y el tiempo de

cambio fue  $< 5$  ms. Las imágenes fueron adquiridas continuamente y almacenadas en un disco SCSI. Los datos a lo largo de la línea de tiempo representan la media de intensidad de luz en una pequeña región medida en cada célula. El ruido de fondo y la señal de autofluorescencia fueron sustraídos en cada longitud de onda.

## 12. ESTUDIOS DE AMPc INTRACELULAR, ANALISIS DE FRET.

Las neuronas hipocampales fueron nucleofectadas con un plasmido que expresa una construcción para FRET con el biosensor ICUE3 (DiPilato and Zhang, 2009). Las neuronas fueron cultivadas durante 2DIV y se examinaron con una cámara CCD C9100-02 (Hamamatsu) y un microscopio Zeiss Axiovert 200, usando una lámpara de Xenon XBO de 75W/2 y un objetivo de 40x/1.3 NA (Zeiss). La longitud de onda de excitación que se utilizó fue 422-432 nm, y la longitud de onda de emisión fueron separadas con un filtro dicróico doble (440-500 nm y 510-610 nm) con filtros de emisión de 460-500 nm y 528.5-555.5 nm para la fluorescencia de CFP e YFP, respectivamente. Las imágenes fueron recogidas y analizadas con el programa Metamorph 7.1 r2 (Universal Imaging) y fueron adquiridas durante 120-140 segundos en intervalos de 15 segundos. Para el análisis de las variaciones en la concentración de AMPc, tratamos las neuronas con diferentes agentes farmacológicos tras 150 segundos de grabación control. La intensidad de la fluorescencia de CFP e YFP se midió en la región distal del axón en neuronas hipocampales utilizando el software de ImageJ. Para el análisis ratiométrico de FRET, la señal de fondo se sustrajo de las señales de CFP e YFP (esta señal de fondo se calculó en una región libre de células utilizando el programa ImageJ) y se normalizó con respecto a los valores control (la media de los datos obtenidos en la grabación control). Finalmente, el valor de FRET fue calculado como el ratio de la señal CFP:YFP. El medio neuronal que contiene Neurobasal con rojo fenol, fue cambiado por uno sin rojo fenol 30 minutos antes del análisis. La concentración de los diferentes agentes farmacológicos que se utilizaron es la siguiente: ADP (5  $\mu$ M), BBG (100 nM) y Forskolina (5  $\mu$ M). Estos tratamientos se aplicaron de forma independiente o tras una incubación previa de 30 minutos con NKY80 (10  $\mu$ M) antes de la adquisición de imágenes, todos estos compuestos estuvieron presentes a lo largo del experimento.



## ***Resultados***

---



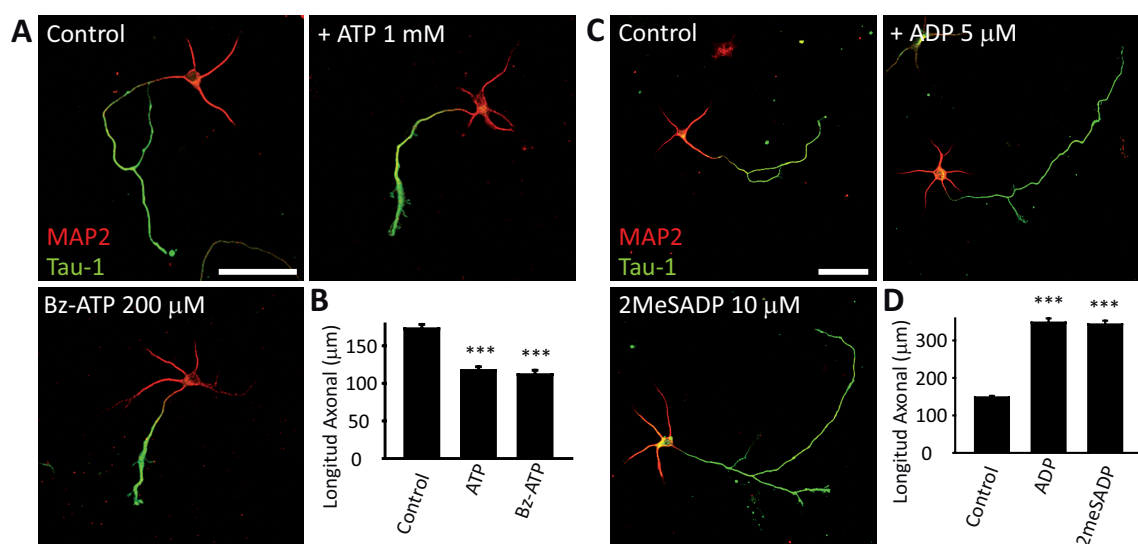


## 1. PAPEL DE LOS NUCLEÓTIDOS DE ADENINA, ADP Y ATP EN LA AXONOGÉNESIS Y ELONGACIÓN AXONAL.

La implicación de los nucleótidos extracelulares en diferentes aspectos del desarrollo y la plasticidad del sistema nervioso (revisado en (Rathbone et al., 1999; Zimmermann, 2006)), impulsó nuestro estudio sobre una posible función del ATP y sus derivados en el proceso de especificación y elongación axonal. Para ello utilizamos el cultivo de neuronas de hipocampo como modelo de estudio. Neuronas de 2 y 24h fueron mantenidas en cultivo en presencia de ATP y ADP, además de sus análogos estables Bz-ATP y 2meSADP respectivamente, hasta las 72h de desarrollo. Posteriormente, utilizamos tinciones inmunocitoquímicas con marcadores específicos del dominio somatodendrítico (MAP2) y del dominio axonal (tau-1) para cuantificar la longitud axonal.

Experimentos preliminares muestran que las neuronas tratadas con nucleótidos en las primeras 2 horas de desarrollo, antes de que tenga lugar la especificación axonal, son capaces de generar un axón como ocurre en las neuronas control fijadas tras 72h en cultivo. Sin embargo, sí observamos diferencias en cuanto a la longitud axonal. En la figura R1 A y B observamos que las neuronas tratadas con ATP (+ 1 mM) presentan axones alrededor de un 30% más cortos ( $117.10 \pm 5.03 \mu\text{m}$ ) comparados con los de las neuronas control ( $172.56 \pm 5.85 \mu\text{m}$ ). Este efecto es también observado en presencia de un análogo de ATP, Bz-ATP (200  $\mu\text{M}$ ), que da lugar a axones más cortos ( $111.48 \pm 5.90 \mu\text{m}$ ). Sin embargo, en la figura R1 C y D, podemos observar que el tratamiento con el producto de degradación del ATP, ADP (5  $\mu\text{M}$ ) provoca el efecto contrario, un aumento de la longitud axonal de aproximadamente un 60% ( $347.70 \pm 11.12 \mu\text{m}$ ) comparado con sus neuronas control ( $148.21 \pm 3.82 \mu\text{m}$ ). Los mismos resultados se observaron utilizando el análogo de ADP, 2meSADP (10  $\mu\text{M}$ ) cuya adición aumenta la longitud axonal hasta  $342.75 \pm 9.99 \mu\text{m}$  con respecto a las neuronas control ( $148.21 \pm 3.82 \mu\text{m}$ ).

Estos datos demuestran que los tratamientos con ATP o ADP no afectan al proceso de axonogénesis, pero sí modulan la elongación axonal con efectos antagónicos. Mientras el ATP actúa como regulador negativo, su



**Figura R1. Los nucleótidos de adenina, ATP y ADP modulan el crecimiento axonal de forma antagónica en neuronas de hipocampo en cultivo.** (A, C) Neuronas de hipocampo de 3 DIV cultivadas durante 48 horas en presencia de ATP (+ 1 mM) y su análogo Bz-ATP (200  $\mu\text{M}$ ) (A) y ADP (+ 5  $\mu\text{M}$ ) y su análogo 2meSADP (10  $\mu\text{M}$ ) (B). Tras 72h en cultivo fueron fijadas y teñidas con anticuerpos dirigidos contra MAP2 y tau-1 para visualizar los compartimentos somatodendrítico y axonal, respectivamente. Barra de escala= 50  $\mu\text{m}$ . (B, D) Media de la longitud axonal de neuronas de 3 DIV mostradas en A y C, respectivamente. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de 3 experimentos independientes (100 neuronas/condición experimental de cada experimento). \*\*\*  $p < 0.001$ .

derivado, el ADP, es un regulador positivo y promueve la elongación axonal en neuronas de hipocampo en cultivo.

## 2. ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DE LOS RECEPTORES P2X EN LA ELONGACIÓN AXONAL. PAPEL DEL RECEPTOR P2X7.

Actualmente sabemos que el ATP activa las siete subunidades P2X descritas, promoviendo un incremento de calcio intracelular (North, 2002; Vial et al., 2004). Asimismo, se ha descrito que los incrementos de calcio intracelular reducen la longitud axonal (Gomez and Spitzer, 1999; Mattson et al., 1990). Por ello, una vez que observamos que el ATP actúa como regulador negativo del crecimiento axonal, quisimos caracterizar cuál de los receptores purinérgicos activados por este nucleótido es responsable de dicho efecto, además de analizar los cambios intracelulares que provocan la reducción de longitud axonal.

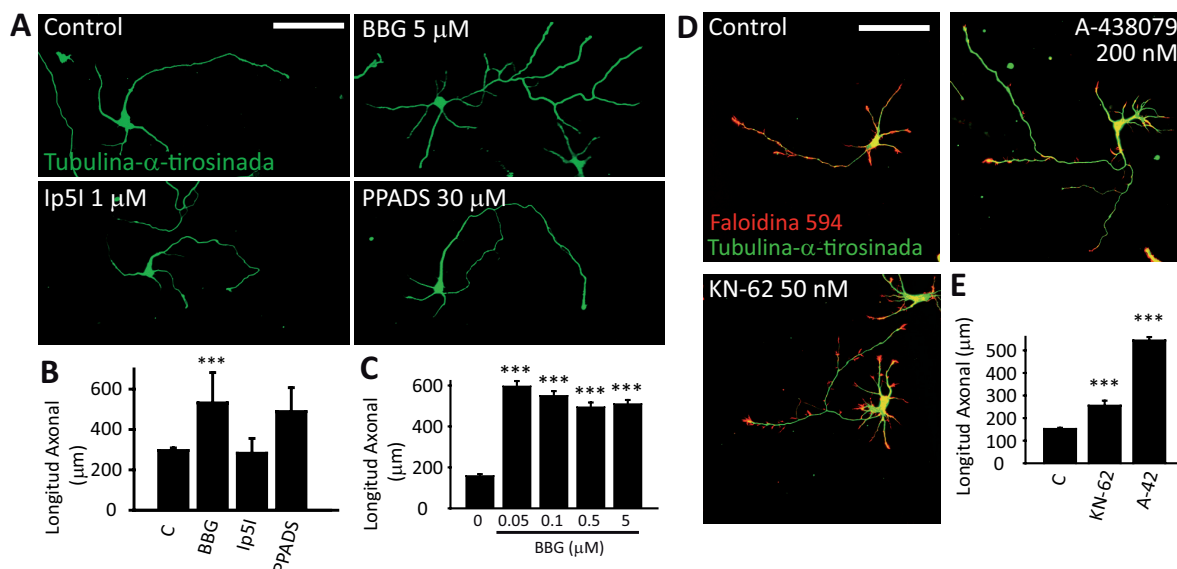
### 2.1. La inhibición farmacológica del receptor P2X7 promueve el crecimiento axonal en neuronas de hipocampo en cultivo.

En una primera aproximación, y con el fin de encontrar el receptor P2X responsable de la reducción de longitud axonal inducida por el tratamiento con ATP, cultivamos neuronas hipocampales en presencia de antagonistas de las diferentes subunidades P2X: Ip5I (1  $\mu$ M) que bloquea P2X1 y P2X3 en el rango micromolar (King et al., 1999), PPADS (30  $\mu$ M) que bloquea P2X2 y P2X4 (North, 2002) y BBG (50 nM - 5  $\mu$ M), antagonista específico del receptor P2X7 (Jiang et al., 2000).

En estos experimentos con antagonistas de diferentes receptores P2X (**Fig. R2 A y B**), observamos que las neuronas tratadas con BBG (5  $\mu$ M) presentan un incremento significativo de longitud axonal ( $531.65 \pm 150.45 \mu$ m) con respecto a las neuronas control ( $295.9 \pm 12.66 \mu$ m) tras 72h en cultivo. Incluso en un rango de concentraciones que varía desde 0.05 a 5  $\mu$ M observamos un incremento de longitud de aproximadamente 3 veces con respecto al control (**Fig. R2C**). Sin embargo, las neuronas tratadas con Ip5I, presentan axones con longitudes similares a las neuronas control. En el caso de las neuronas tratadas con PPADS, observamos un incremento de longitud axonal ( $488.66 \pm 118.71 \mu$ m vs  $295.9 \pm 12.66 \mu$ m en neuronas control); esto podría deberse a que el PPADS a la concentración utilizada también puede funcionar como antagonista del receptor P2X7 en ratón (Hibell et al., 2001).

Para confirmar el efecto observado al inhibir el receptor P2X7 con BBG, cultivamos neuronas de hipocampo en presencia de otros dos antagonistas específicos de P2X7, KN-62 y el A-438079 (Humphreys et al., 1998; McGaraughty et al., 2007) en las mismas condiciones que en los experimentos anteriores. En la figura R2 D y E, observamos que tanto las neuronas tratadas con KN-62 (50 nM) como con A-438079 (200 nM), presentan axones más largos ( $254.86 \pm 22.25 \mu$ m y  $543.71 \pm 15.44 \mu$ m, respectivamente) en relación a las neuronas control ( $151.78 \pm 5.34 \mu$ m), y similar al observado en neuronas tratadas con BBG.

De este grupo de experimentos extraemos, que a diferencia del resto de receptores P2X, la inhibición del receptor P2X7 con antagonistas específicos, promueve un incremento significativo de crecimiento axonal en neuronas de hipocampo en cultivo, en oposición a lo que observamos con el tratamiento con su agonista, ATP.



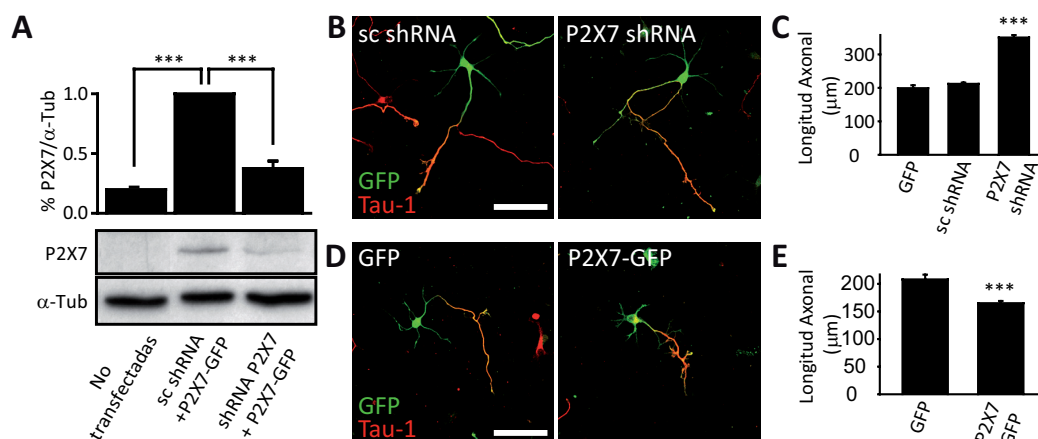
**Figura R2. La inhibición del receptor P2X7 induce un aumento de la longitud axonal en neuronas de hipocampo en cultivo.** (A) Neuronas de hipocampo de 3 DIV cultivadas durante 48 horas en presencia de BBG (5 μM), Ip5I (1 μM) y PPADS (30 μM). Tras 72h en cultivo fueron fijadas y teñidas con anticuerpos dirigidos contra tubulina-α-tirosinada para visualizar la morfología neuronal. Barra de escala= 50 μm. (B) Media de la longitud axonal de neuronas de 3 DIV mostradas en A. Los datos representan la media ± desviación estándar de 3 experimentos independientes (100 neuronas/condición experimental de cada experimento). \*\*\* p<0.001. (C) Media de la longitud axonal de neuronas de 3 DIV sin tratar (control) y tratadas con BBG a diferentes concentraciones (0.05 – 5 μM). Los datos representan la media ± error estándar de 3 experimentos independientes (100 neuronas/condición experimental de cada experimento). \*\*\* p<0.001. (D) Neuronas de hipocampo de 3 DIV cultivadas durante 48 horas en presencia KN-62 (50 nM) y A-438079 (200 nM). Tras 72h en cultivo fueron fijadas y teñidas con anticuerpos dirigidos contra tubulina-α-tirosinada y faloidina 594 para visualizar la morfología neuronal. Barra de escala= 50 μm. (E) Media de la longitud axonal de neuronas de las neuronas mostradas en D. Los datos representan la media ± error estándar de 3 experimentos independientes (100 neuronas/condición experimental de cada experimento). \*\*\* p<0.001.

## 2.2. Modificaciones en la expresión del receptor P2X7 inducen variaciones en la elongación axonal en neuronas de hipocampo en cultivo.

Como segundo abordaje para confirmar el papel del receptor P2X7 en los efectos observados durante la elongación axonal, nucleofectamos neuronas de hipocampo con diferentes vectores génicos para modificar la expresión de dicho receptor. Por un lado, utilizamos un vector de sobreexpresión del receptor P2X7 y por otro, se diseñó un sistema de silenciamiento génico utilizando la tecnología de ARN de interferencia, para bloquear su expresión.

La eficiencia de los vectores de expresión y de interferencia, se comprobó en células HEK293T, debido a la baja eficiencia de nucleofección que obtenemos en neuronas y que imposibilita su comprobación por western-blot. Estas células, que no expresan el receptor P2X7 de forma nativa, fueron co-transfectadas con el vector de expresión de P2X7 (P2X7-GFP) junto con el vector de interferencia de P2X7 (shRNA P2X7) o el vector control del interferente (*scrambled* shRNA). Finalmente, la expresión del receptor P2X7 se cuantificó mediante la técnica de western blot con un anticuerpo dirigido contra P2X7. En la figura R3A observamos que la expresión exógena de P2X7 se redujo específicamente un 65% en las células co-transfectadas con el vector de interferencia shRNA P2X7 a diferencia de las células co-transfectadas con el vector control shRNA. Una vez confirmada la eficiencia y especificidad de los vectores de expresión y de interferencia, nucleofectamos dichos

vectores en neuronas hipocampales en el momento previo a su plaqueo. Estas neuronas se mantuvieron en cultivo durante 72 horas y pasado este tiempo se fijaron y se tiñeron inmunocitoquímicamente con anticuerpos anti- $\alpha$ -tubulina, para observar su morfología. Las neuronas positivas para la expresión de los diferentes vectores se detectaron por inmunofluorescencia, gracias a la expresión de la proteína GFP que se utilizó como marcador fluorescente en todas las construcciones. En la figura R3 B y C observamos que las neuronas que expresan el vector de interferencia de P2X7 (shRNA P2X7) tienen axones significativamente más largos ( $350.51 \pm 7.20 \mu\text{m}$ ) a diferencia de las neuronas que expresan el vector control de interferencia (sc shRNA) ( $199.10 \pm 8.69 \mu\text{m}$ ). Por el contrario, las neuronas que expresan el receptor P2X7 exógeno (P2X7-GFP) presentan axones más cortos ( $164.98 \pm 4.02 \mu\text{m}$ ) a diferencia de las neuronas que expresan GFP como control ( $208.00 \pm 8.65 \mu\text{m}$ ) (Fig. R3 D y E).



**Figura R3. El vector de interferencia del receptor P2X7 induce un incremento de la longitud axonal, mientras que su sobre-expresión regula de forma negativa el crecimiento axonal en neuronas hipocampales.** (A) Expresión del receptor P2X7 en células HEK-293T sin transfectar o co-transfectadas con el vector de expresión del receptor P2X7 (P2X7-GFP) y el vector de interferencia del receptor P2X7 (P2X7 shRNA) o el vector *scrambled* (sc shRNA). La gráfica representa el % de los niveles de expresión de P2X7 normalizados con la expresión de  $\alpha$ -tubulina como control de carga (media  $\pm$  error estándar,  $n = 3$  experimentos independientes). \*\*\*  $p < 0.001$ . (B) Neuronas de hipocampo de 3 DIV nucleofectadas con plásmidos sc shRNA y el vector de interferencia del receptor P2X7 (P2X7 shRNA). Barra de escala = 50  $\mu\text{m}$ . (C) Cuantificación de la longitud axonal de las neuronas descritas en B (media  $\pm$  error estándar,  $n = 3$  experimentos independientes, 100 neuronas/condición experimental de cada experimento). \*\*\*  $p < 0.001$ . (D) Neuronas de hipocampo de 3 DIV nucleofectadas con plásmidos control (GFP) y el vector de sobre-expresión del receptor P2X7 (P2X7-GFP). Barra de escala = 50  $\mu\text{m}$ . (E) Cuantificación de la longitud axonal de las neuronas descritas en D (media  $\pm$  error estándar,  $n = 3$  experimentos independientes, 100 neuronas/condición experimental de cada experimento). \*\*\*  $p < 0.001$ .

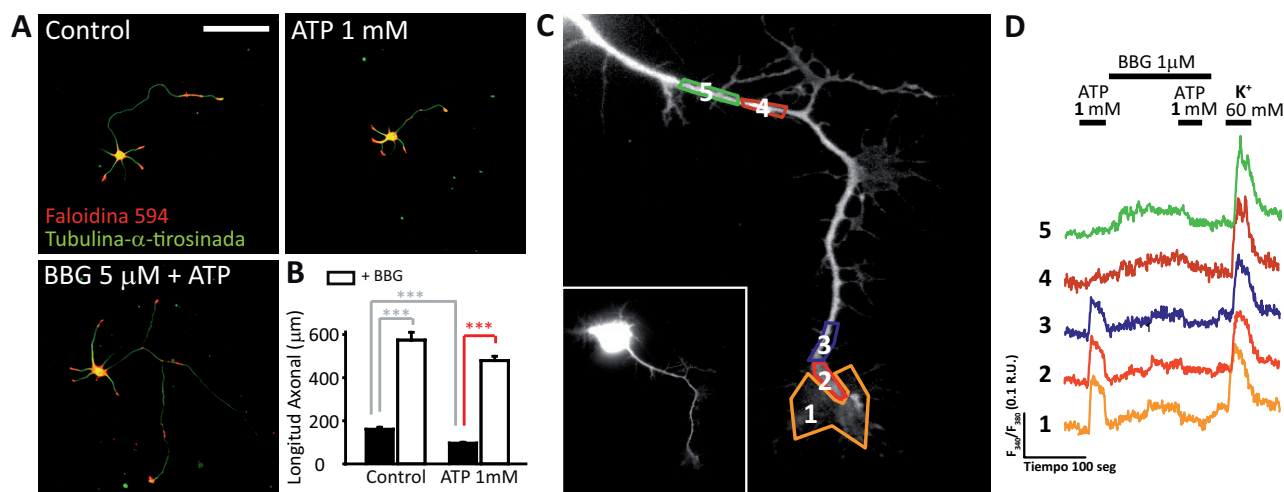
A la luz de estos resultados, podemos concluir que el bloqueo de la expresión del receptor P2X7 induce un aumento de crecimiento axonal, similar al observado en las neuronas tratadas con BBG; mientras que la sobre-expresión de dicho receptor provoca el efecto contrario, como observábamos en neuronas tratadas con ATP. Por tanto, estos resultados confirman el papel del receptor P2X7 en el desarrollo axonal que habíamos mostrado previamente con experimentos farmacológicos.

### 2.3. El receptor P2X7 es el responsable de la entrada de $\text{Ca}^{+2}$ en la zona más distal del axón.

Tras analizar los resultados anteriores, quisimos confirmar que el efecto del tratamiento con ATP en la longitud axonal de neuronas de hipocampo es dependiente del receptor P2X7. Para ello, tratamos neuronas

de hipocampo tras 24h de desarrollo con ATP (+ 1 mM) hasta las 72h en cultivo en presencia del antagonista BBG (100 nM) y cuantificamos la longitud axonal (**Fig. R4 A y B**). En los resultados apreciamos que las neuronas tratadas con ATP en presencia de BBG presentan axones más largos que el control ( $478.94 \pm 20.14 \mu\text{m}$  vs  $161.10 \pm 9.02 \mu\text{m}$  en neuronas control), es decir, el bloqueo del receptor P2X7 inhibe la reducción de longitud axonal que observamos con el tratamiento con ATP ( $96.41 \pm 4.04 \mu\text{m}$ ).

Asimismo, con el fin de completar este conjunto de experimentos, quisimos comprobar si la entrada de calcio dependiente de ATP en neuronas de hipocampo en cultivo, es resultado de la activación del receptor P2X7. En la figura R4 C y D observamos que el tratamiento con ATP (+ 1 mM) produce un incremento en la concentración



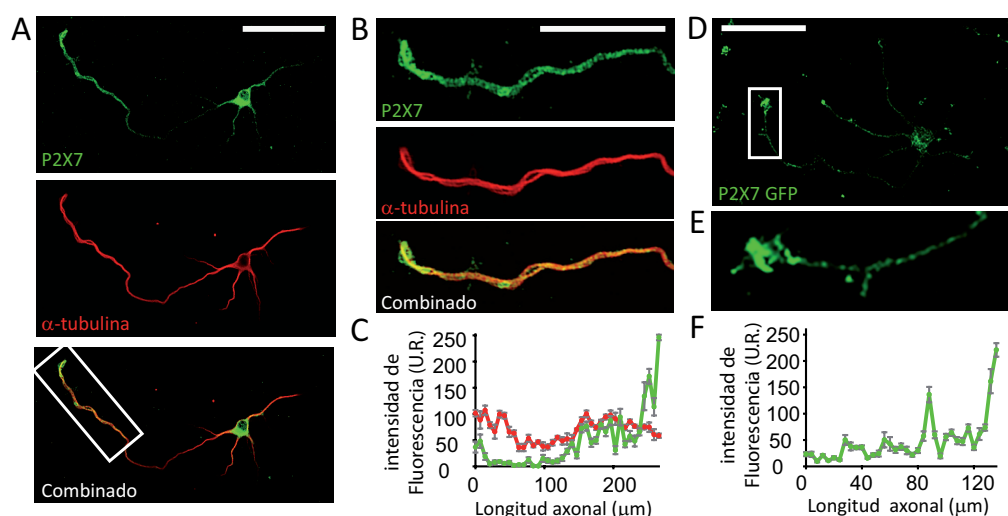
**Figura R4. El tratamiento con BBG bloquea la reducción de longitud axonal y la entrada de calcio en la zona más distal del axón promovida por el tratamiento con ATP.** (A) Neuronas de hipocampo de 3 DIV cultivadas durante 48 horas con ATP (+ 1 mM) en presencia o ausencia de BBG (5  $\mu\text{M}$ ). Tras 72h en cultivo fueron fijadas y teñidas con un anticuerpo dirigido contra tubulina- $\alpha$ -tirocinada y faloidina 594, para visualizar la morfología de la neurona. Barra de escala= 50  $\mu\text{m}$ . (B) Cuantificación de la longitud axonal de neuronas de hipocampo tratadas con ATP (+ 1 mM) en presencia (blanco) o ausencia (negro) de BBG (5  $\mu\text{M}$ ) (media  $\pm$  error estándar,  $n = 3$  experimentos independientes, 100 neuronas/condición experimental de cada experimento). \*\*\* $p < 0.001$ . (C) Ampliación de la región axonal de la neurona mostrada en el recuadro inferior. En la imagen se muestra la señal de fluorescencia de una neurona cargada con la sonda Fura-2AM, en la que se analizaron las variaciones de la concentración de calcio en cinco áreas diferentes nombradas de 1 a 5. (D) Representación de los cambios de fluorescencia de la sonda Fura-2AM a lo largo del tiempo en las áreas seleccionadas. Las líneas representan la relación entre las longitudes de onda 340/380 nm. Las neuronas fueron estimuladas con ATP (+ 1 mM) en presencia o ausencia de BBG (1  $\mu\text{M}$ ). Las barras sólidas indican el periodo de estimulación. Para comprobar la viabilidad de las neuronas al final del experimento se estimularon con un pulso de KCl (60 mM).

de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular en la zona más distal del axón, como se ha descrito previamente (Díaz-Hernández\*, del Puerto\* et al., 2008). Tras la primera estimulación con ATP, se añadió BBG (1  $\mu\text{M}$ ) al medio para bloquear la actividad del receptor P2X7. En los resultados observamos que el tratamiento con BBG bloquea el incremento de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular inducido por el tratamiento con ATP en la zona más distal del axón (**Fig. R4D**). Por tanto, el incremento de  $\text{Ca}^{+2}$  observado tras el tratamiento con ATP es específicamente dependiente del receptor P2X7. En este experimento, para comprobar la viabilidad de las neuronas, se estimularon aumentando la concentración de potasio en el medio extracelular con KCl (60 mM), observando un incremento de la concentración de calcio en toda la neurona.

Por tanto, podemos concluir que el receptor P2X7, activado por ATP extracelular, promueve la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  en la zona más distal del axón, regulando de forma negativa el proceso de elongación axonal en neuronas de hipocampo en cultivo.

## 2.4. El receptor purinérgico P2X7 se localiza en la zona más distal del axón en neuronas de hipocampo en cultivo.

Una vez estudiado el papel del receptor P2X7 en la elongación axonal, analizamos su patrón de expresión en neuronas de hipocampo en cultivo. Para ello, en neuronas cultivadas durante 72 horas, marcamos con técnicas de inmunocitoquímica el receptor P2X7, utilizando un anticuerpo específico, junto con un marcador de morfología ( $\alpha$ -tubulina). En la figura R5A observamos que el receptor P2X7 se expresa en el soma neuronal y a lo largo del axón, formando un gradiente que aumenta hacia el cono de crecimiento axonal, ocupando la zona rica en actina (**Fig. R5B**). Este patrón se confirmó mediante la cuantificación a lo largo del axón de la intensidad de fluorescencia de los marcajes de P2X7 y  $\alpha$ -tubulina tiosinada utilizando el programa ImageJ (**Fig. R5C**).



**Figura R5. Localización del receptor P2X7 en neuronas de hipocampo en cultivo.** (A) Imagen representativa de neuronas de hipocampo de 72h en cultivo en la que se muestra la localización de P2X7 (verde),  $\alpha$ -tubulina (rojo) y la combinación de ambos marcajes (abajo) a lo largo del axón. Barra de escala= 50  $\mu$ m. (B) Ampliación de la región distal del axón marcada en A. (C) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia a lo largo del axón de 3 neuronas diferentes, representada como media  $\pm$  sem cada 10  $\mu$ m (unidades relativas, U.R.). La intensidad de fluorescencia de P2X7 se representa en verde mientras que la de  $\alpha$ -tubulina se representa en rojo. (D) Imagen representativa de una neurona nucleofectada con el vector de expresión del receptor P2X7 (P2X7-GFP) mantenida en cultivo 72h. Barra de escala= 50  $\mu$ m. (E) Ampliación de la región distal del axón marcada en C. (F) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia a lo largo del axón de 3 neuronas diferentes, representada como media  $\pm$  sem cada 5  $\mu$ m (unidades relativas, U.R.).

Asimismo, analizamos cómo se distribuye la expresión del vector P2X7 en neuronas hipocámpales que sobreexpresan dicho receptor, utilizando la expresión de GFP como indicador. En la figura R5D, observamos que el receptor P2X7 se localiza principalmente en el soma y en el dominio axonal, presentando una distribución similar a la observada con el marcaje con el anticuerpo específico, observando una mayor expresión en el cono de crecimiento axonal, como se aprecia en la ampliación (**Fig. R5E**). Finalmente, realizamos una cuantificación de la intensidad de fluorescencia del vector de expresión de P2X7-GFP a lo largo del axón con el programa ImageJ, que representamos en la figura R5F.

Con este grupo de resultados confirmamos que el receptor P2X7 se localiza en la zona más distal del axón en neuronas hipocámpales coincidiendo con la zona donde se observa un incremento de calcio tras el tratamiento con ATP.

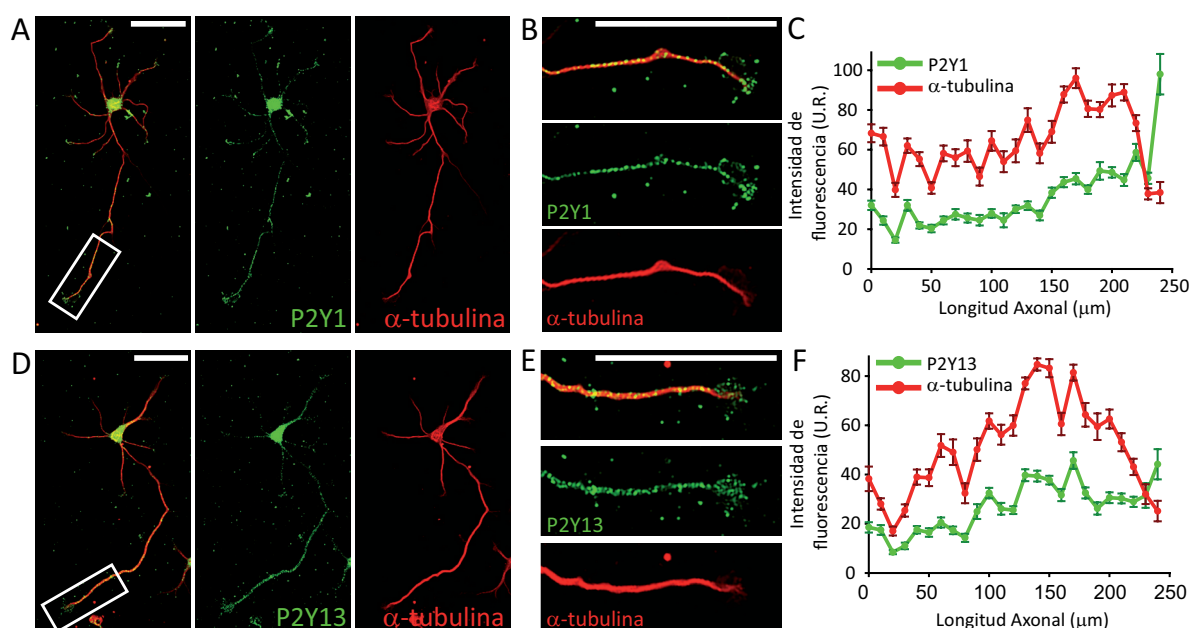


### 3. ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DE LOS RECEPTORES P2Y EN LA ELONGACIÓN AXONAL. PAPEL DE LOS RECEPTORES P2Y1 Y P2Y13.

Una vez analizada la función del ATP y el receptor P2X7 durante el desarrollo axonal, nuestro siguiente objetivo fue analizar el mecanismo por el cual el tratamiento con ADP genera el incremento de longitud y ramificación axonal descrito anteriormente (**Fig. R1 C y D**). Dentro de la familia de los receptores P2Y, el ADP actúa principalmente a través de tres subtipos, P2Y1, P2Y12 y P2Y13 (Burnstock, 2007b). Como comentamos previamente en la introducción, los receptores P2Y1 y P2Y13 se expresan en neuronas de hipocampo (Csolle et al., 2008), mientras que el receptor P2Y12 se expresa en tronco cerebral, en neuronas ganglionares de la raíz dorsal (Heinrich et al., 2008) y en oligodendrocitos, pero en ningún caso está presente en neuronas hipocámpales o neocorticales (Amadio et al., 2006; Hollopeter et al., 2001). Por tanto, inicialmente descartamos el receptor P2Y12 por no expresarse en nuestro modelo de estudio y nos centramos en los receptores P2Y1 y P2Y13 como posibles candidatos para mediar los efectos del ADP en neuronas de hipocampo en cultivo.

#### 3.1. Los receptores purinérgicos P2Y1 y P2Y13 se localizan en la zona más distal del axón en neuronas de hipocampo en cultivo.

En primer lugar, quisimos analizar el patrón de expresión de ambos receptores purinérgicos en neuronas. Para ello, realizamos tinciones inmunocitoquímicas en neuronas de hipocampo cultivadas durante 72h. En las imágenes observamos que ambos receptores tienen patrones similares de expresión, localizándose en la zona

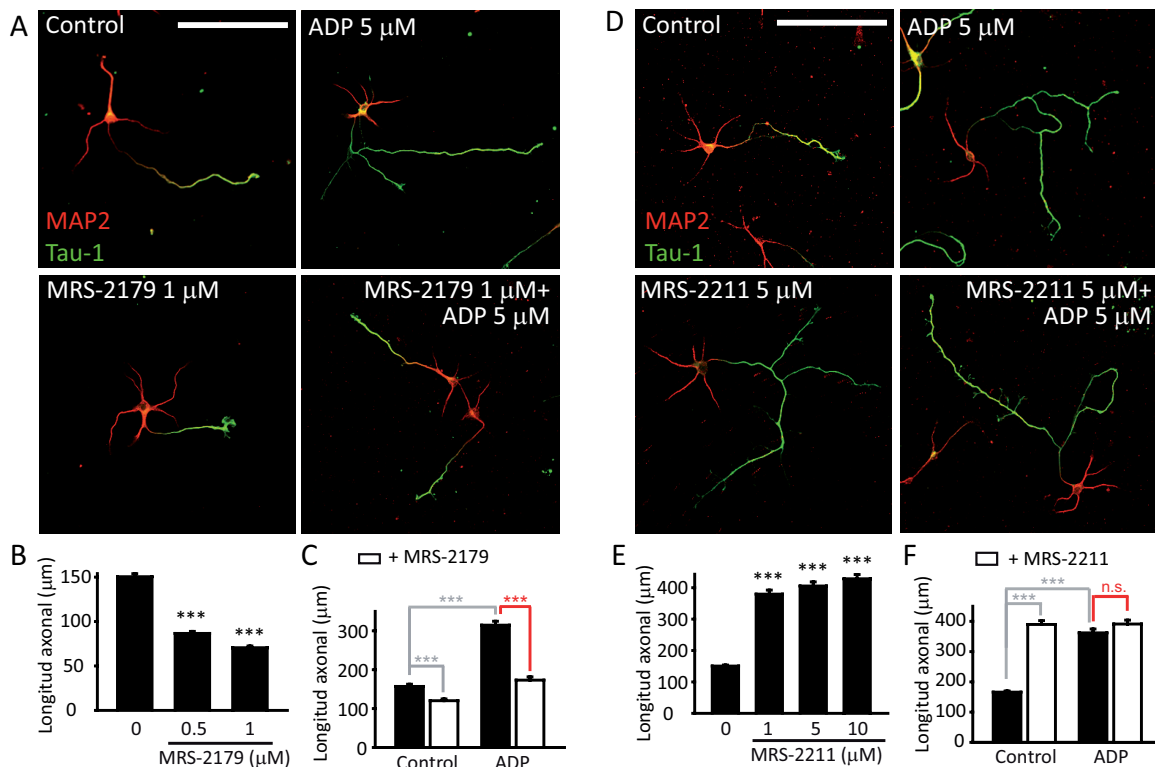


**Figura R6. Localización de los receptores P2Y1 y P2Y13 en neuronas de hipocampo en cultivo.** (A) Imagen representativa de neuronas de hipocampo de 72h en cultivo en la que se muestra la localización de P2Y1 (verde),  $\alpha$ -tubulina (rojo) y la combinación de ambos marcajes a lo largo del axón. Barra de escala= 50  $\mu$ m. (B) Ampliación de la región distal del axón marcada en A. Barra de escala= 50  $\mu$ m. (C) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia a lo largo del axón de 3 neuronas diferentes, representada como media  $\pm$  sem cada 10  $\mu$ m (unidades relativas, U.R.). La intensidad de fluorescencia de P2Y1 se representa en verde mientras que la de  $\alpha$ -tubulina se representa en rojo. (D) Imagen representativa de neuronas de hipocampo de 72h en cultivo en la que se muestra la localización de P2Y13 (verde),  $\alpha$ -tubulina (rojo) y la combinación de ambos marcajes a lo largo del axón. Barra de escala= 50  $\mu$ m. (E) Ampliación de la región distal del axón marcada en D. (F) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia a lo largo del axón de 3 neuronas diferentes, representada como media  $\pm$  sem cada 10  $\mu$ m (unidades relativas, U.R.). La intensidad de fluorescencia de P2Y13 se representa en verde mientras que la de  $\alpha$ -tubulina se representa en rojo.

más distal del axón de neuronas hipocampales, además del soma y, en menor medida, en las prolongaciones dendríticas (**Fig. R6 A, B, D y E**). Esta percepción visual se confirmó cuando cuantificamos la intensidad de fluorescencia de ambos receptores a lo largo del axón (proximal-distal) en paralelo con la intensidad del marcaje de  $\alpha$ -tubulina (**Fig. R6 C y F**). Cabe destacar que estos receptores ocupan también el territorio del citoesqueleto de actina en el cono de crecimiento axonal, como ocurría con el receptor P2X7.

### 3.2. La inhibición farmacológica de los receptores P2Y1 y P2Y13 promueve efectos antagónicos durante el proceso de elongación axonal en neuronas de hipocampo en cultivo.

En un primer abordaje, quisimos analizar la influencia de los receptores P2Y activados por ADP a lo largo del desarrollo axonal en neuronas de hipocampo. Para ello utilizamos antagonistas específicos de los receptores



**Figura R7. Efectos de la inhibición de los receptores P2Y1 y P2Y13 en la elongación axonal en neuronas hipocampales.**

(A) Neuronas de hipocampo de 3 DIV cultivadas durante 48 horas con ADP (5  $\mu$ M), MRS-2179, 1  $\mu$ M y una combinación de ambos. Tras 72h en cultivo fueron fijadas y teñidas con anticuerpos dirigidos contra MAP2 y Tau-1 para visualizar los dominios somatodendrítico y axonal, respectivamente. Barra de escala= 50  $\mu$ m. (B) Media de la longitud axonal de neuronas de 3DIV sin tratar (control) y tratadas con MRS-2179 (0.5 y 1  $\mu$ M). Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de 3 experimentos independientes (100 neuronas/condición experimental de cada experimento). \*\*\* p<0.001. (C) Media de la longitud axonal de neuronas de 3 DIV sin tratar (control) y tratadas mostradas en A. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de 3 experimentos independientes (100 neuronas/condición experimental de cada experimento). \*\*\* p<0.001. (D) Neuronas de hipocampo de 3 DIV cultivadas durante 48 horas con ADP (5  $\mu$ M), MRS-2211, 5  $\mu$ M y una combinación de ambos. Tras 72h en cultivo fueron fijadas y teñidas con anticuerpos dirigidos contra MAP2 y Tau-1 para visualizar los dominios somatodendrítico y axonal, respectivamente. Barra de escala= 50  $\mu$ m. (E) Media de la longitud axonal de neuronas de 3DIV sin tratar (control) y tratadas con MRS-2211 (1, 5 y 10  $\mu$ M). Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de 3 experimentos independientes (100 neuronas/condición experimental de cada experimento). \*\*\* p<0.001. (F) Media de la longitud axonal de neuronas de 3 DIV sin tratar (control) y tratadas mostradas en D. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de 3 experimentos independientes (100 neuronas/condición experimental de cada experimento). \*\*\* p<0.001, n.s.= no significativo.



P2Y1 y P2Y13, MRS-2179 y el MRS-2211, respectivamente. Las neuronas de hipocampo fueron mantenidas en cultivo en presencia de estos antagonistas hasta las 72 horas de desarrollo. En este momento se fijaron y se tiñeron inmunocitoquímicamente con marcadores de dominio somatodendrítico (MAP2) y dominio axonal (tau-1), para cuantificar la longitud axonal con el programa NeuronJ. Las neuronas tratadas con el antagonista del receptor P2Y1, MRS-2179, a diferentes concentraciones (500 nM y 1  $\mu$ M) presentan axones más cortos ( $86.63 \pm 2.30 \mu\text{m}$  y  $70.54 \pm 1.94 \mu\text{m}$ , respectivamente) comparados con los axones de neuronas control ( $150.47 \pm 3.42 \mu\text{m}$ ) (**Fig. R7 A y B**). Asimismo, el incremento significativo en la elongación axonal generado por el tratamiento con 5  $\mu$ M ADP ( $314.46 \pm 10.08 \mu\text{m}$  vs  $156.93 \pm 5.70 \mu\text{m}$  en neuronas control) no se produce cuando las neuronas son co-tratadas con 1  $\mu$ M MRS-2179 ( $173.14 \pm 8.47 \mu\text{m}$ ) (**Fig. R7 A y C**). Estos datos indican que el ADP promueve un incremento de la elongación axonal a través del receptor P2Y1.

Por otro lado, cultivamos neuronas de hipocampo en presencia del antagonista del receptor P2Y13, MRS-2211 a diferentes concentraciones (1, 5, 10  $\mu$ M) (**Fig. R7 D y E**). Estas neuronas presentaban axones significativamente más largos que las neuronas control ( $379.49 \pm 12.00 \mu\text{m}$ ,  $405.39 \pm 13.14 \mu\text{m}$  y  $428.40 \pm 13.68 \mu\text{m}$  respectivamente vs  $105.47 \pm 3.42 \mu\text{m}$  en neuronas control). Además, el tratamiento combinado de MRS-2211 (5  $\mu$ M) con ADP genera un efecto similar que el tratamiento con ambos compuestos por separado, es decir, un incremento significativo de la longitud axonal ( $391.12 \pm 12.99 \mu\text{m}$  vs  $389.73 \pm 12.75 \mu\text{m}$  en neuronas tratadas con ADP) (**Fig. R7 D y F**).

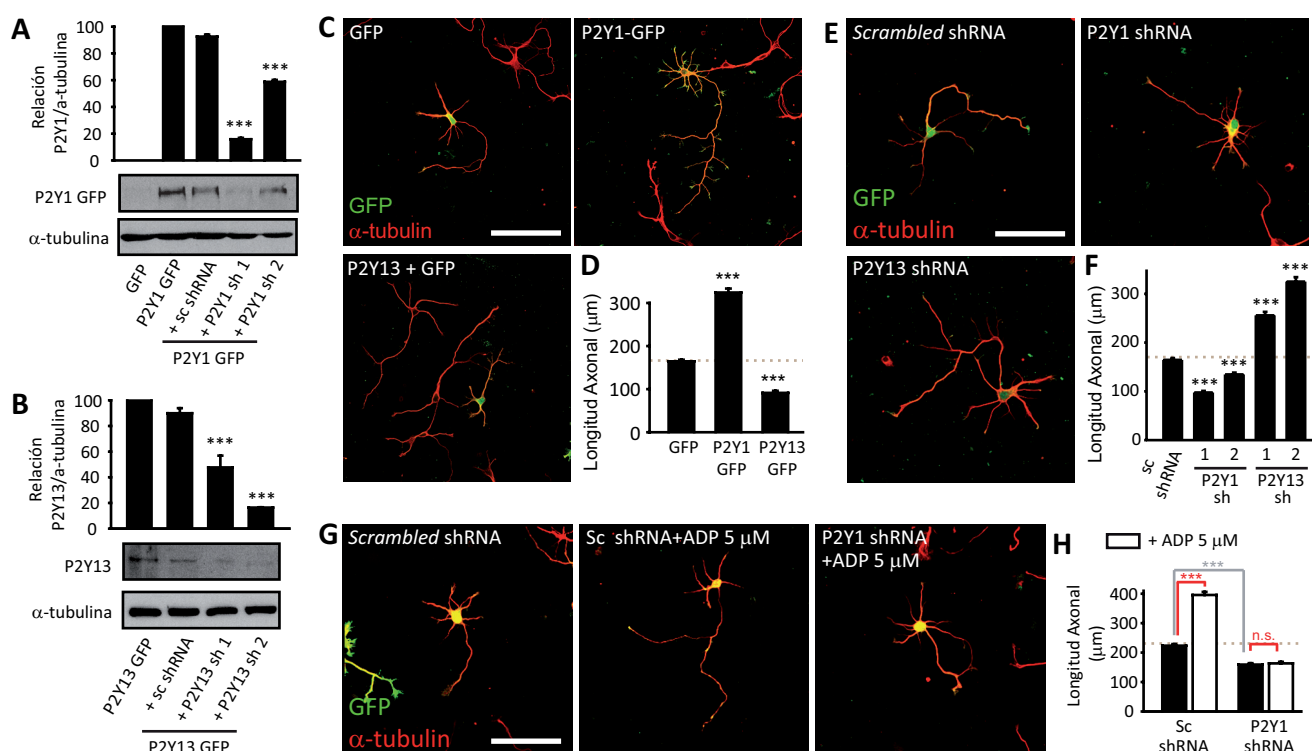
Estos resultados indican que el ADP regula de forma positiva el crecimiento axonal a través del receptor P2Y1, sin embargo, el receptor P2Y13 regula este proceso de forma negativa en neuronas de hipocampo en cultivo.

### 3.3. Modificaciones en la expresión de los receptor P2Y1 y P2Y13 inducen variaciones en la elongación axonal de neuronas de hipocampo en cultivo.

En una segunda aproximación, utilizamos vectores de expresión y vectores con dos secuencias diferentes de RNA de interferencia específicos para modificar la expresión de los receptores P2Y1 y P2Y13 en neuronas de hipocampo en cultivo, con el objetivo de confirmar los datos obtenidos en el abordaje farmacológico. Todos los vectores expresan la proteína GFP como marcador fluorescente para detectar las neuronas que expresan las diferentes construcciones, a excepción del vector de expresión del receptor P2Y13, en cuyo caso, requerimos de una co-nucleofección con un plásmido control de GFP en una relación 1:6, lo que nos permite asegurarnos que las células que expresan GFP también expresan el receptor P2Y13 de forma exógena. La eficiencia de los vectores de expresión y de interferencia, se comprobó de nuevo en células HEK293T por western blot. Estas células, fueron transfectadas solo con el vector de expresión de P2Y1 (P2Y1-GFP) o co-transfectadas con el vector de expresión de P2Y13 y GFP, en ausencia o presencia de los respectivos vectores de interferencia (P2Y1 shRNA y P2Y13 shRNA) o el vector control (*scrambled* shRNA). En el caso del receptor P2Y1 observamos un descenso de la expresión de P2Y1 de un 80% y un 40% con los vectores de interferencia 1 y 2, respectivamente (**Fig. R8A**) con respecto al control. En el caso del receptor P2Y13, observamos que los vectores de interferencia 1 y 2 generan un descenso de la expresión del 50% y 80%, respectivamente, con respecto al vector control (**Fig. R8B**).

Una vez comprobada la eficiencia de las diferentes construcciones, nucleofectamos neuronas hipocámpales con los vectores de expresión de ambos receptores y las secuencias de interferencia específicas para cada receptor, en el momento previo al plaqueo. Estas neuronas fueron mantenidas en cultivo 72 horas y posteriormente fueron fijadas y teñidas con técnicas de inmunocitoquímica para marcar la morfología neuronal.

En los resultados podemos observar que los axones de las neuronas que sobre-expresan P2Y1 exógeno (P2Y1-GFP) son significativamente más largos ( $324.24 \pm 9.24 \mu\text{m}$ ) que en las neuronas control (GFP) ( $164.53 \pm 3.73 \mu\text{m}$ ) (**Fig. R8 C y D**). Este incremento es similar al que observamos con el tratamiento con ADP, mientras que las neuronas que expresan los vectores de interferencia de P2Y1 (P2Y1 shRNA 1 y 2) presentan axones significativamente más cortos ( $97.60 \pm 3.26 \mu\text{m}$  y  $134.66 \pm 3.68 \mu\text{m}$ ) comparados con los de las neuronas control (*scrambled* shRNA;  $169.54 \pm 3.92 \mu\text{m}$ ) (**Fig. R8 E y F**). En un experimento adicional, observamos que las neuronas que expresan el vector de interferencia del receptor P2Y1 y que han sido sometidas a un tratamiento con ADP ( $5 \mu\text{M}$ ) presentan axones significativamente más cortos que aquellas neuronas control tratadas con ADP en las mismas condiciones ( $163.29 \pm 5.22 \mu\text{m}$  vs  $395.67 \pm 10.58 \mu\text{m}$  en neuronas control tratadas con ADP) (**Fig. R8 G y H**). Es decir, el tratamiento con ADP promueve un incremento de longitud axonal en aquellas neuronas que expresan el receptor P2Y1. Por tanto, a la luz de estos resultados podemos



**Figura R8. Efectos de los plásmidos de expresión y de interferencia de los receptores P2Y1 y P2Y13 en neuronas hipocampales.** (A, B) Células HEK293T fueron co-transfectadas con plásmidos GFP, P2Y1-GFP (A) o P2Y13 + GFP (B), en combinación con vectores de interferencia de P2Y1 y P2Y13 (P2Y1shRNA y P2Y13shRNA, respectivamente). Los extractos celulares se analizaron por western-blot para analizar la expresión de P2Y1 y P2Y13 con anticuerpos específicos. Los gráficos representan la media  $\pm$  sem de 3 experimentos independientes. La expresión de P2Y1 y P2Y13 se normalizó con los niveles de expresión de  $\alpha$ -tubulina como control de carga. \*\*\* $p < 0.001$ . (C) Neuronas hipocampales de 3 DIV nucleofectadas con plásmidos que expresan GFP, P2Y1-GFP y P2Y13+GFP. Las neuronas nucleofectadas se identificaron por su expresión de GFP y además se marcaron inmunocitoquímicamente con  $\alpha$ -tubulina para identificar su morfología. Barra de escala=  $50 \mu\text{m}$ . (D) Cuantificación de la longitud axonal de las neuronas mostradas en C y representada como media  $\pm$  sem de 3 experimentos independientes (100 neuronas/condición experimental de cada experimento) \*\*\* $p < 0.001$ . (E) Neuronas hipocampales nucleofectadas con un vector control (*scrambled* shRNA), vectores de interferencia de los receptores P2Y1 y P2Y13. Las neuronas se fijaron tras 3 DIV y se marcaron con un anticuerpo anti- $\alpha$ -tubulina. Las neuronas nucleofectadas se identificaron por su fluorescencia de GFP. Barra de escala=  $50 \mu\text{m}$ . (F) Cuantificación de la longitud axonal de las neuronas que expresan el vector control y dos vectores de interferencia diferentes para los receptores P2Y1 y P2Y13 (P2Y1shRNA 1 y 2 o P2Y13shRNA 1 y 2), representada como media  $\pm$  sem de 3 experimentos independientes (100 neuronas/condición experimental de cada experimento) \*\*\* $p < 0.001$ . (G) Neuronas hipocampales nucleofectadas con el vector control (*scrambled* shRNA) o P2Y1 shRNA y tratadas con ADP ( $5 \mu\text{M}$ ) desde las 24 a las 27h in vitro. Marcadas inmunocitoquímicamente con  $\alpha$ -tubulina para observar la morfología neuronal. Barra de escala=  $50 \mu\text{m}$ . (H) Cuantificación de la longitud axonal de neuronas nucleofectadas (GFP-positivas) con el vector control y el vector de interferencia de P2Y1 en presencia o ausencia de ADP ( $5 \mu\text{M}$ ) representada como media  $\pm$  sem de 3 experimentos independientes (100 neuronas/condición experimental de cada experimento) \*\*\* $p < 0.001$ , n.s.= no significativo. La línea gris punteada mostrada en D, F y H representa la media de la longitud axonal de la condición control en cada experimento.

concluir que el receptor P2Y1 es un regulador positivo del crecimiento axonal.

Por otro lado, el silenciamiento del receptor P2Y13 con sus secuencias de interferencia (P2Y13 shRNA 1 y 2) promueve un efecto similar a su antagonista, un aumento significativo del crecimiento axonal ( $255.80 \pm 7.17 \mu\text{m}$  y  $325.05 \pm 9.24 \mu\text{m}$  vs  $169.54 \pm 3.92 \mu\text{m}$  en neuronas control sc shRNA) (**Fig. R8 E y F**). Por el contrario, su sobreexpresión exógena con el vector de expresión (P2Y13+GFP) induce la formación de axones más cortos ( $91.36 \pm 4.77 \mu\text{m}$  vs  $164.53 \pm 3.73 \mu\text{m}$  en neuronas control) (**Fig. R8 C y D**). Por tanto, el receptor P2Y13 es un regulador negativo del crecimiento axonal.

Tanto el abordaje farmacológico como la modificación de la expresión génica nos permiten concluir, que estamos ante dos receptores purinérgicos, el receptor P2Y1 y el receptor P2Y13 activados por el mismo agonista, el ADP, que regulan el proceso de elongación axonal de forma antagónica; siendo el receptor P2Y1 un regulador positivo, promoviendo crecimiento axonal y el receptor P2Y13 un regulador negativo, retardando dicho proceso.

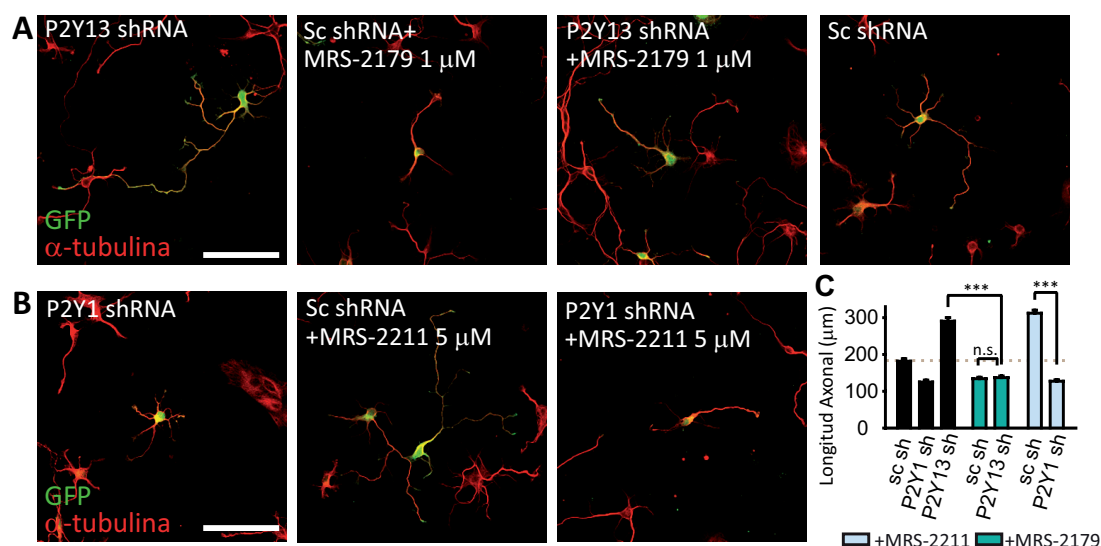
#### 4. REGULACIÓN COORDINADA DE LOS RECEPTORES PURINÉRGICOS DURANTE LA ELONGACIÓN AXONAL.

Hasta el momento, hemos descrito que los nucleótidos extracelulares actúan a través de tres receptores purinérgicos en la modulación del proceso de crecimiento axonal. Un receptor ionotrópico activado por ATP, el receptor P2X7, que regula negativamente el crecimiento axonal a través de la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  en el cono de crecimiento, y dos receptores metabotrópicos activados por ADP, los receptores P2Y1 y P2Y13, cuyos efectos en la modulación de este proceso son antagónicos. A la luz de estos resultados, quisimos estudiar la posible existencia de una regulación coordinada de estos receptores a lo largo del desarrollo axonal, que module dicho proceso en función de la concentración extracelular de los diferentes nucleótidos.

##### 4.1. La inhibición o supresión del receptor P2Y13 no promueve el crecimiento axonal en ausencia de la actividad del receptor P2Y1 en neuronas de hipocampo en cultivo.

Puesto que los receptores P2Y1 y P2Y13 comparten un agonista común, el ADP, y presentan efectos antagónicos a lo largo del desarrollo axonal, planteamos un grupo de experimentos adicional, con los que analizar la contribución relativa de los receptores P2Y1 y P2Y13 a lo largo del crecimiento axonal. Para ello hicimos abordajes combinados, utilizando vectores de interferencia de ambos receptores y sus antagonistas específicos. En neuronas de hipocampo en cultivo, nucleofectamos el vector de interferencia del receptor P2Y1 y las tratamos con el antagonista específico del receptor P2Y13 (MRS-2211), o bien el vector de interferencia del receptor P2Y13 en combinación con el antagonista específico del receptor P2Y1 (MRS-2179). En estas condiciones las neuronas de hipocampo tienen bloqueada la actividad de ambos receptores purinérgicos, así podemos estudiar cuál de los efectos descritos para cada uno de ellos prevalece sobre los del otro. Pasadas 72h de cultivo en las condiciones descritas, fijamos las neuronas y las teñimos inmunocitoquímicamente para cuantificar la longitud axonal de las neuronas que presentan un marcaje positivo para GFP con el programa NeuronJ.

En los resultados se aprecia que al silenciar la expresión del receptor P2Y1 con su vector de interferencia



**Figura R9. El efecto de inhibición o supresión del receptor P2Y1 enmascara el efecto de inhibición o supresión del receptor P2Y13 durante la elongación axonal en neuronas hipocampales.** (A) Neuronas de hipocampo en cultivo nucleofectadas con el vector control (*scrambled* shRNA) o el vector de interferencia de P2Y13 (P2Y13 shRNA) y mantenidas en cultivo en presencia o ausencia de MRS-2179, 1  $\mu$ M hasta los 3DIV. (B) Neuronas de hipocampo en cultivo nucleofectadas con el vector control (*scrambled* shRNA) o el vector de interferencia de P2Y1 (P2Y1 shRNA) y mantenidas en cultivo en presencia o ausencia de MRS-2211, 5  $\mu$ M hasta los 3DIV. En A y B las neuronas nucleofectadas se identificaron por su fluorescencia de GFP y se marcaron con anticuerpo anti- $\alpha$ -tubulina para visualizar su morfología. Barra de escala= 50  $\mu$ m. (C) Cuantificación de la longitud axonal de las neuronas nucleofectadas (GFP-positivas) mostradas en A y B representada como media  $\pm$  sem de 3 experimentos independientes (100 neuronas/condición experimental de cada experimento) \*\*\* $p$ <0.001. La línea gris punteada representa la media de la longitud axonal de las neuronas control.

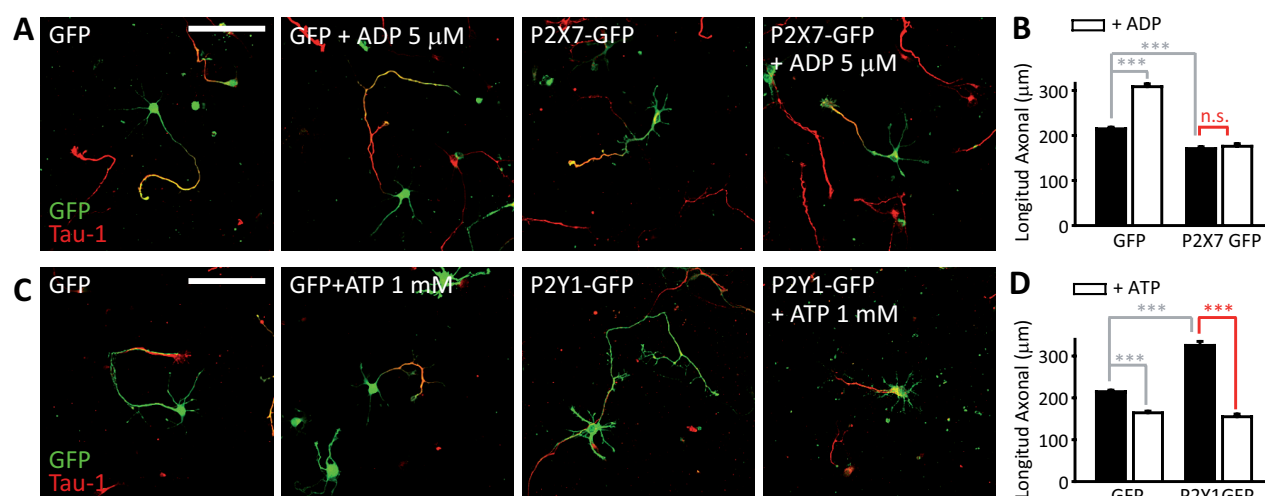
en presencia de MRS-2211 (5  $\mu$ M), obtenemos axones significativamente más cortos ( $127.27 \pm 4.14 \mu\text{m}$ ) que las neuronas control ( $181.70 \pm 6.96 \mu\text{m}$ ), por tanto no se produce el aumento de longitud axonal que observábamos al inhibir el receptor P2Y13 ( $312.04 \pm 8.45 \mu\text{m}$ ) (Fig. R9 B y C). De igual forma, el aumento de longitud axonal descrito en neuronas que expresan el vector de interferencia del receptor P2Y13 ( $290.44 \pm 9.87 \mu\text{m}$ ) es bloqueado por el antagonista del receptor P2Y1, MRS2179, que da lugar a axones más cortos ( $137.09 \pm 4.67 \mu\text{m}$ ), con relación al control ( $181.70 \pm 6.96 \mu\text{m}$ ) (Fig. R9 A y C).

En este grupo de experimentos observamos, que tanto la inhibición del receptor P2Y1 como su silenciamiento génico enmascaran los efectos generados al suprimir la actividad del receptor P2Y13 durante el crecimiento axonal, que quedan subordinados a la actividad del primero. Esto podría ser la razón por la que en nuestro modelo neuronal, el tratamiento con ADP, que activa a ambos receptores, induce un incremento de longitud axonal, efecto propio de la activación del receptor P2Y1 y no del P2Y13. Por tanto podemos concluir que actividad del receptor P2Y1 es necesaria y suficiente para promover la elongación axonal, y que dicha actividad prevalece sobre la actividad del receptor P2Y13, que actuaría en un segundo plano, como modulador negativo del crecimiento axonal en la vía de señalización mediada por ADP.

#### 4.2. La modulación de la elongación axonal mediada por ADP es dependiente de la actividad del receptor P2X7.

Una vez estudiada la jerarquía que subyace en los efectos del ADP sobre los receptores P2Y1 y P2Y13, diseñamos una serie de experimentos para analizar la posible regulación entre los receptores metabotrópicos, P2Y1 y P2Y13, activados por ADP y el receptor ionotrópico P2X7, activado por ATP.

En una primera aproximación cuantificamos la longitud axonal en neuronas en las que previamente activamos ambas vías de señalización, aquella activada por ATP mediada por P2X7 y la vía dependiente de ADP a través de la activación de P2Y1, así podemos estudiar su influencia durante el proceso de elongación axonal. Para ello, nucleofectamos neuronas de hipocampo con el vector de expresión de P2X7 exógeno y las tratamos con ADP (5  $\mu$ M); por otro lado, en neuronas que sobre-expresan el receptor P2Y1 tras su nucleofección hicimos un tratamiento con ATP (+1 mM). Estas neuronas fueron mantenidas en cultivo durante 3 días para su posterior análisis. Finalmente las fijamos para teñirlas inmunocitoquímicamente con un marcador axonal, tau-1, para así cuantificar la longitud del axón en neuronas que expresan el vector de expresión (positivas para GFP). En ambas combinaciones observamos que, tanto las neuronas que sobre-expresan el receptor P2X7 tratadas con ADP (5  $\mu$ M) (**Fig. R10A**), como las que sobre-expresan el receptor P2Y1 tratadas con ATP (1

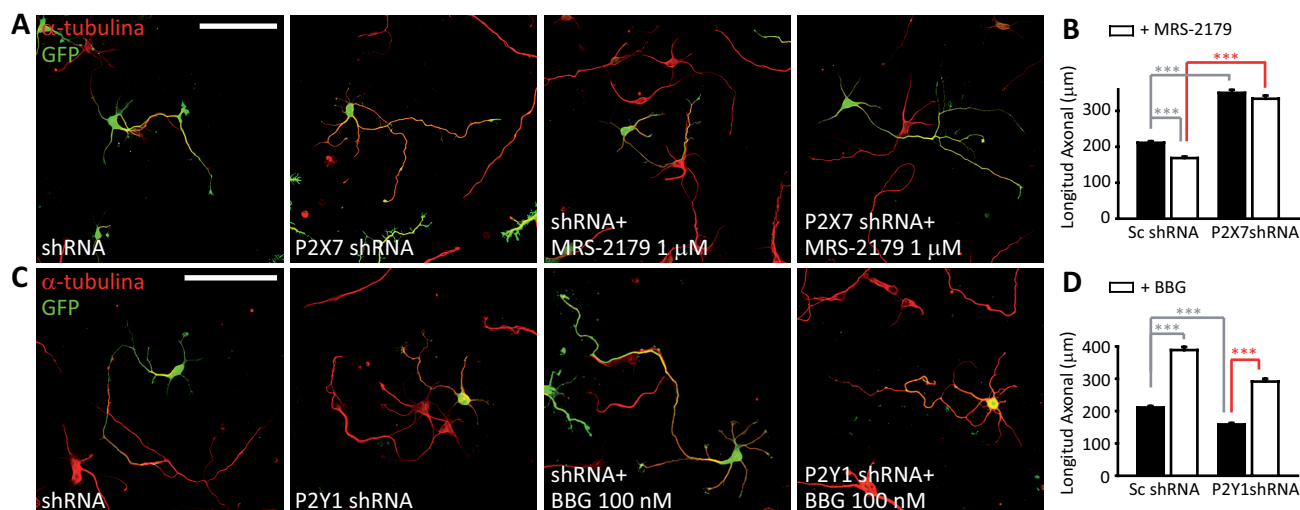


**Figura R10. La regulación de la elongación axonal mediada por ADP es dependiente de la actividad del receptor P2X7 (I).** (A) Neuronas de hipocampo en cultivo nucleofectadas con el vector control (GFP) o el vector de expresión de P2X7 (P2X7-GFP) y mantenidas en cultivo en presencia o ausencia de ADP, 5 $\mu$ M hasta los 3DIV. (C) Neuronas de hipocampo en cultivo nucleofectadas con el vector control (GFP) o el vector de expresión de P2Y1 (P2Y1-GFP) y mantenidas en cultivo en presencia o ausencia de ATP, 1 mM hasta los 3DIV. En A y C las neuronas nucleofectadas se identificaron por su fluorescencia de GFP y se marcaron con anticuerpo anti-Tau-1 para identificar el axón. Barra de escala= 50  $\mu$ m. (B y D) Cuantificación de la longitud axonal de las neuronas nucleofectadas (GFP-positivas) mostradas en A y C, respectivamente, y representada como media  $\pm$  sem de 3 experimentos independientes (100 neuronas/condición experimental de cada experimento) \*\*\*p<0.001, n.s.= no significativo.

mM) (**Fig. R10B**), presentan axones más cortos con respecto al control ( $154.89 \pm 6.33 \mu$ m y  $175.98 \pm 5.81 \mu$ m, respectivamente vs  $214.83 \pm 3.61 \mu$ m en neuronas control), como ocurre con el tratamiento con ATP ( $162.30 \pm 4.02 \mu$ m) y cuando expresamos el receptor P2X7 de forma exógena ( $170.96 \pm 4.10 \mu$ m) (**Fig. R10 B y D**). Por tanto, los efectos de crecimiento promovidos por el ADP y por la expresión exógena del receptor P2Y1 quedan silenciados. Estos datos indican que los efectos observados durante el proceso de elongación axonal dependientes del receptor P2X7 predominan sobre aquellos regulados por la vía de señalización mediada por ADP.

Para apoyar esta hipótesis, diseñamos un segundo abordaje, esta vez nucleofectamos neuronas de hipocampo con vectores de ARN de interferencia de los receptores P2Y1 o P2X7 y las mantuvimos en cultivo en presencia del antagonista de P2X7 (BBG) o P2Y1 (MRS-2179), siguiendo el esquema descrito en los experimentos del apartado anterior. Tras 72h de tratamiento, cuantificamos la longitud axonal y observamos que las neuronas de hipocampo nucleofectadas con el vector de interferencia de P2X7 y tratadas con MRS-2179 (1





**Figura R11. La regulación de la elongación axonal mediada por ADP es dependiente de la actividad del receptor P2X7 (II).** (A) Neuronas de hipocampo en cultivo nucleofectadas con el vector control (scrambled shRNA) o el vector de interferencia de P2X7 (P2X7 shRNA) y mantenidas en cultivo en presencia o ausencia de MRS-2179, 1 μM (antagonista del receptor P2Y1) hasta los 3DIV. (C) Neuronas de hipocampo en cultivo nucleofectadas con el vector control (scrambled shRNA) o el vector de interferencia de P2Y1 (P2Y1 shRNA) y mantenidas en cultivo en presencia o ausencia de BBG, 100 nM (antagonista del receptor P2X7) hasta los 3DIV. En A y C las neuronas nucleofectadas se identificaron por su fluorescencia de GFP y se marcaron con anticuerpo anti-α-tubulina para identificar la morfología neuronal. Barra de escala= 50 μm. (B y D) Cuantificación de la longitud axonal de las neuronas nucleofectadas (GFP-positivas) mostradas en A y C, respectivamente, y representada como media ± sem de 3 experimentos independientes (100 neuronas/condición experimental de cada experimento) \*\*\*p<0.001.

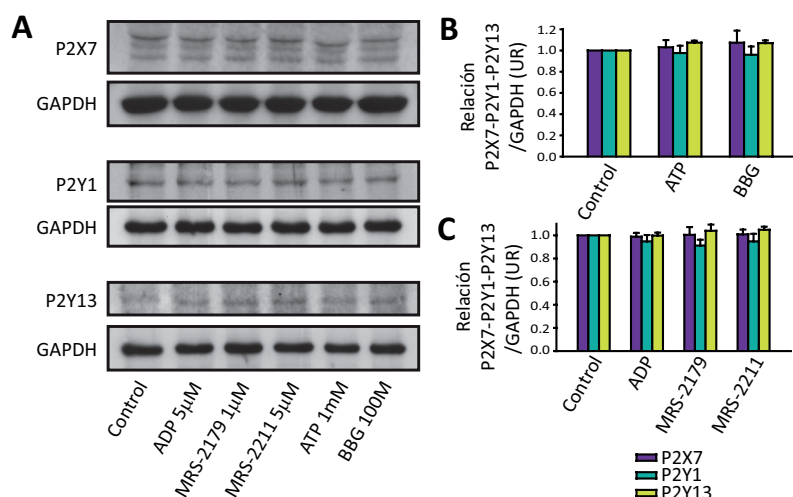
μM), presentaban un incremento significativo de la longitud axonal ( $333.86 \pm 8.84 \mu\text{m}$ ) con respecto a las neuronas control ( $211.27 \pm 4.48 \mu\text{m}$ ) (**Fig. R11 A y B**). Del mismo modo, las neuronas que expresan el vector de interferencia del receptor P2Y1 en presencia de BBG (100 nM) presentan axones más largos que el control ( $291.34 \pm 8.70 \text{ mm}$  vs  $211.27 \pm 4.48 \mu\text{m}$  en neuronas control). (**Fig. R11 C y D**) Este efecto de crecimiento axonal que encontramos en ambas combinaciones está asociado al tratamiento con el antagonista de P2X7 (BBG) y al silenciamiento de la expresión de este receptor de forma independiente. Por tanto, en ausencia de actividad del receptor P2X7, el crecimiento axonal es mayor incluso cuando la actividad del receptor P2Y1 está reducida.

Este grupo de experimentos nos permiten concluir que el crecimiento axonal observado al activar la vía de señalización mediada por ADP es dependiente del estado de activación del receptor P2X7, que en último término determina la tasa de crecimiento axonal en neuronas de hipocampo en cultivo.

#### 4.3. La modificación de la actividad de los receptores P2Y1, P2Y13 y P2X7 de forma independiente, no modifica los niveles de expresión de los mismos en neuronas de hipocampo en cultivo.

Una vez descrita la relación existente entre los receptores purinérgicos estudiados en esta tesis, nos planteamos que dicha relación de jerarquía respecto a sus efectos en el desarrollo axonal, pudiera deberse a cambios en la expresión de los receptores. De esta forma, la modificación en la actividad de cada uno de los receptores podría estar modificando la expresión de los demás de una forma coordinada para modular el crecimiento axonal, en función de la concentración de nucleótidos extracelulares.

Para estudiar esta hipótesis, cuantificamos mediante western blot la expresión de los receptores P2X7, P2Y1 y P2Y13 (**Fig. R12A**) con anticuerpos específicos en neuronas de hipocampo cultivadas durante 72 horas en presencia de los diferentes agonistas y antagonistas del receptor P2X7 y de los receptores P2Y1 y P2Y13: ATP



**Figura R12. Los tratamientos con agonistas y antagonistas de los receptores P2Y1, P2Y13 y P2X7 no modifican sus niveles de expresión.** (A) Ensayo de Western-blot realizado a partir de extractos totales de neuronas hipocámpicas tratadas con ADP (+ 5 μM), MRS-2179 (1 μM), MRS-2211 (5 μM), ATP (+ 1 mM) y BBG (100 nM) durante 72h. Se analizaron los niveles de expresión de los receptores P2Y1, P2Y13 y P2X7 utilizando anticuerpos específicos dirigidos contra estos receptores. Como control de carga se utilizó el anticuerpo GAPDH. (B y C) Las gráficas muestran los niveles normalizados de P2Y1, P2Y13 y P2X7/GAPDH (media ± error estándar, n=3 experimentos independientes) con los diferentes tratamientos.

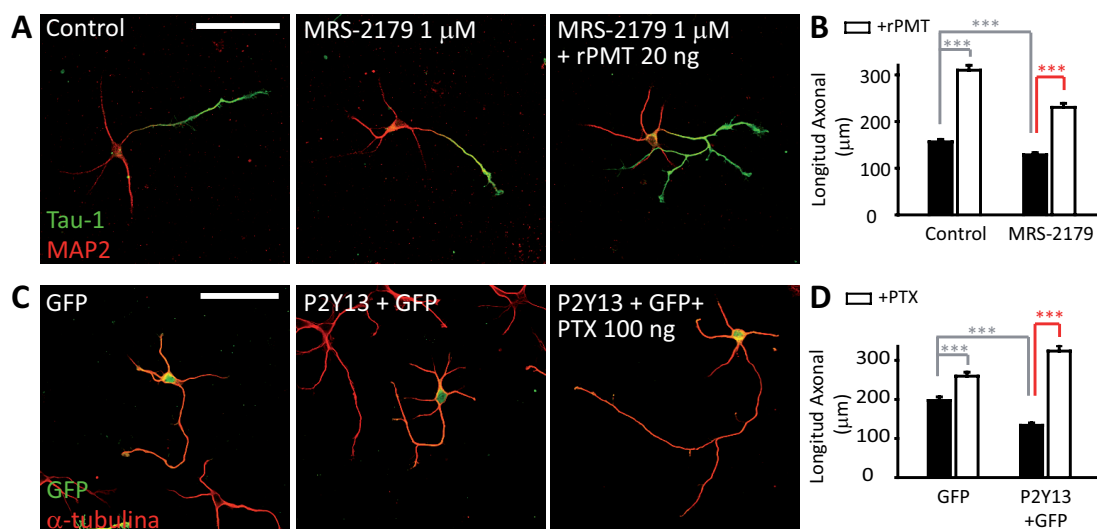
(+1 mM) y BBG (100 nM) (**Fig. R12 A y B**) y ADP (5 μM), MRS-2179 (1 μM) y MRS-2211 (5 μM) (**Fig. R12 A y C**), respectivamente. En los resultados observamos que los niveles de expresión de los tres receptores no varían de forma significativa en neuronas de hipocampo cultivadas en presencia de los diferentes tratamientos. Es decir, que la regulación coordinada del proceso de elongación axonal por parte de los receptores purinérgicos no es debida a modificaciones en sus niveles de expresión producidos por cambios en su actividad. En vista de los resultados obtenidos, nos planteamos una segunda hipótesis, en la que los receptores P2Y1, P2Y13 y P2X7 pudieran estar modulando de forma coordinada una vía de señalización común, implicada en el proceso de elongación axonal.

## 5. ESTUDIO DE UN MECANISMO DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR COMÚN MEDIADO POR LOS RECEPTORES P2Y1, P2Y13 Y P2X7 PARA MODULAR EL PROCESO DE ELONGACIÓN AXONAL EN NEURONAS DE HIPOCAMPO EN CULTIVO.

En este apartado se describe una vía de señalización común modulada por los receptores P2Y1, P2Y13 y P2X7. Antes de analizar los resultados, vamos a recordar brevemente los mecanismos de señalización descritos para cada receptor hasta el momento (Burnstock, 2008; Erb et al., 2006). El receptor P2X7 es un receptor purinérgico ionotrópico, cuya activación promueve la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior de la neurona; por otro lado, los receptores P2Y1 y P2Y13 son receptores metabotrópicos de siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G (Burnstock et al., 2011b). Por un lado, el receptor P2Y1, a través de proteínas  $G_{q/11}$ , puede activar PLC (Fosfolipasa C) y PKC (Proteína quinasa C); y por otro, el receptor P2Y13, a través de proteínas  $G_{i/o}$  inhibe la actividad de adenilato ciclasa reduciendo los niveles de AMPc en la célula. Partiendo de estas premisas, utilizamos diferentes abordajes para estudiar nuestra hipótesis que resumimos en los siguientes apartados.

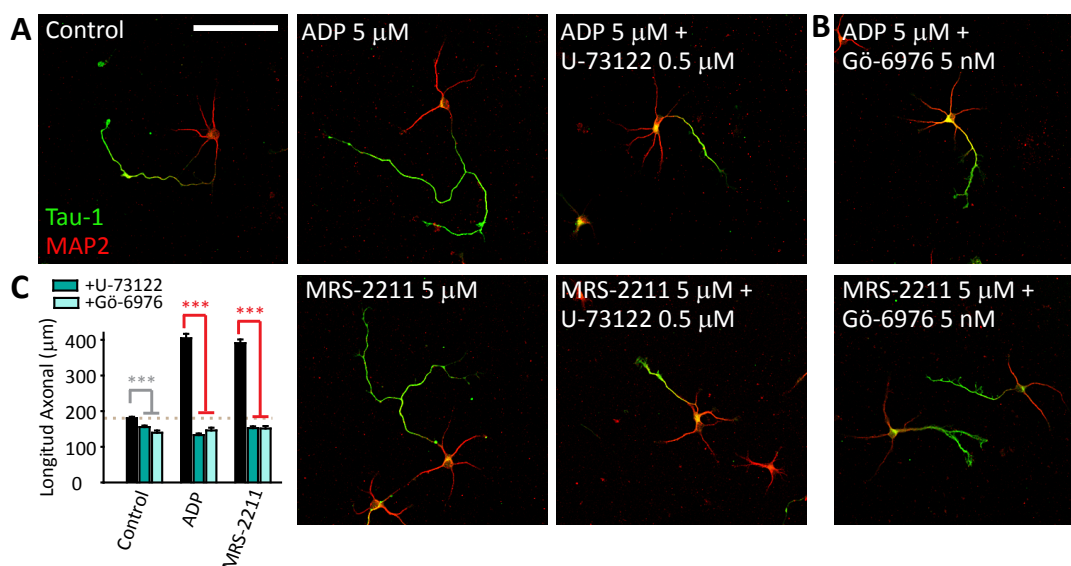
### 5.1. Comprobación de la vía de señalización descrita para los receptores P2Y1 y P2Y13 en nuestro modelo de neuronas de hipocampo en cultivo.

En primer lugar comprobamos que los receptores P2Y1 y P2Y13 modulan el crecimiento axonal a través de proteínas  $G_q$  y  $G_i$ , respectivamente, en nuestro modelo de cultivo. En la figura R13A, observamos que la



**Figura R13.** Los receptores P2Y1 y P2Y13 regulan el proceso de elongación axonal a través de la activación de proteínas  $G_q$  y  $G_i$ , respectivamente en neuronas hipocámpicas. (A) Neuronas de hipocampo de 3 DIV cultivadas durante 48 horas con MRS-2179, 1  $\mu$ M (antagonista del receptor P2Y1) en presencia o ausencia del péptido activador de proteínas  $G_q$  (rPMT, 20 ng). Tras 72h en cultivo fueron fijadas y teñidas con anticuerpos dirigidos contra MAP2 y Tau-1 para visualizar los dominios somatodendrítico y axonal, respectivamente. Barra de escala= 50  $\mu$ m. (B) Media de la longitud axonal de neuronas mostradas en A. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de 3 experimentos independientes (100 neuronas/condición experimental de cada experimento). \*\*\* p<0.001. (C) Neuronas nucleofectadas con un vector control (GFP) solo o co-nucleofectadas con el plásmido de expresión del receptor P2Y13 (P2Y13) y tratadas con PTX, 100 ng (péptido inhibidor de proteínas  $G_i$ ). Tras 72h en cultivo fueron fijadas y teñidas inmunohistoquímicamente con  $\alpha$ -tubulina para observar su morfología. Barra de escala= 50  $\mu$ m. (D) Media de la longitud axonal de neuronas mostradas en A. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de 3 experimentos independientes (100 neuronas/condición experimental de cada experimento). \*\*\* p<0.001.

activación de proteína  $G_q$ , con un péptido recombinante (rPMT, 20 ng/ml), promueve crecimiento axonal en neuronas de hipocampo mantenidas en cultivo durante 3 días ( $230.47 \pm 8.55 \mu\text{m}$  vs  $156.56 \pm 5.25 \mu\text{m}$  en neuronas control), revertiendo el efecto negativo ( $128.70 \pm 4.68 \mu\text{m}$ ) que induce el antagonista del



**Figura R14.** La inhibición de PLC y PKC inhibe efecto de crecimiento axonal mediado por el ADP y la inhibición del receptor P2Y13. Neuronas control y tratadas con ADP (5  $\mu$ M) en presencia o ausencia de U-73122 (0.5  $\mu$ M) (A) o con Gö-6976 (5 nM) en combinación con ADP (5  $\mu$ M) o MRS-2211 (5  $\mu$ M) (B) durante 72h y teñidas con MAP2 y Tau-1, para marcar los dominios somatodendrítico y axonal, respectivamente. Barra de escala= 50  $\mu$ m. (C) Cuantificación de la longitud axonal de las neuronas mostradas en A y B y representadas como media  $\pm$  error estándar de 3 experimentos independientes (100 neuronas/condición experimental de cada experimento). \*\*\* p<0.001. La línea gris punteada representa la media de la longitud axonal de las neuronas control.



receptor P2Y1, MRS-2179 durante el crecimiento axonal (**Fig. R13 A y B**). Por otro lado, mientras que la expresión exógena del receptor P2Y13 reduce la longitud axonal ( $133.67 \pm 6.09 \mu\text{m}$  vs  $197.20 \pm 9.25 \mu\text{m}$  en neuronas control), este efecto negativo es bloqueado por la inhibición de la proteína  $G_i$  con toxina pertúsica (PTX 100 ng/ml), la cual promueve un aumento significativo de crecimiento axonal ( $323.76 \pm 12.22 \mu\text{m}$ ) en neuronas que sobre-expresan de forma exógena el receptor P2Y13 (**Fig. R13 C y D**). Por tanto, los efectos de elongación axonal mediados por receptores P2Y1 y P2Y13 están en relación con la función de proteínas  $G_q$  y  $G_i$ , respectivamente en neuronas de hipocampo en cultivo.

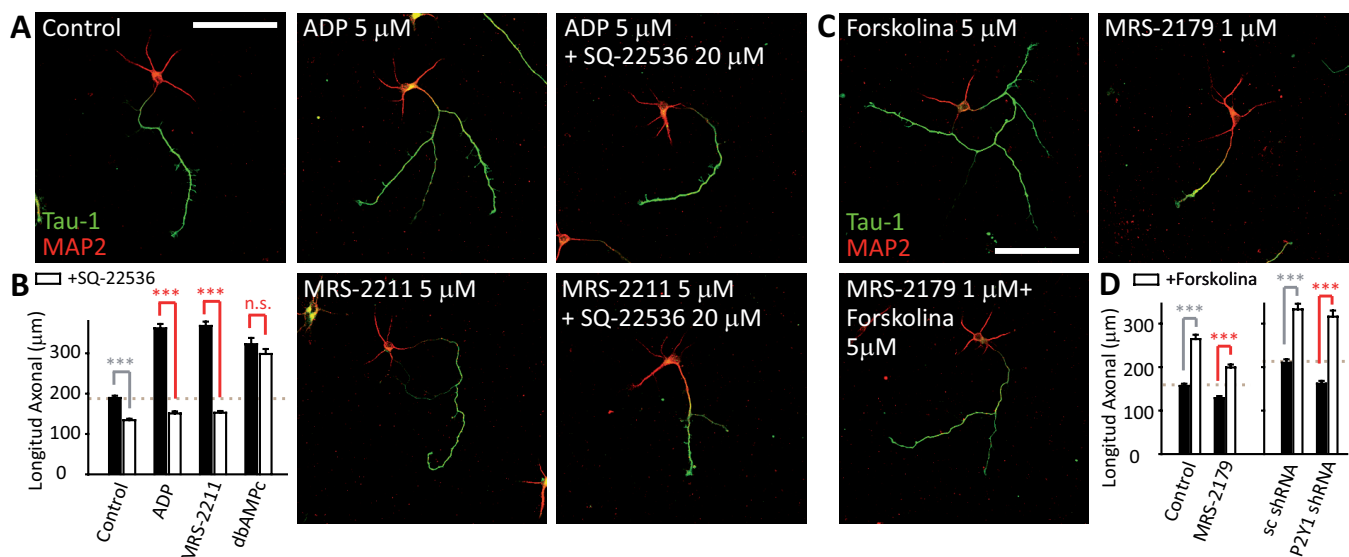
Asimismo, quisimos analizar si el receptor P2Y1 media la activación de PLC y PKC para promover crecimiento axonal. En un abordaje similar a los anteriores, cultivamos neuronas de hipocampo durante 72 horas añadiendo ADP al medio neuronal, combinado con inhibidores selectivos de PLC y PKCs, U-73122 ( $0.5 \mu\text{M}$ ) y Gö-6976 ( $5 \text{ nM}$ ) respectivamente. Cuantificamos la longitud axonal y observamos que la inhibición de PLC en presencia de ADP reduce la longitud axonal ( $132.80 \pm 4.49 \mu\text{m}$ ), en comparación con las neuronas tratadas con ADP ( $404.51 \pm 12.34 \mu\text{m}$ ) y con las neuronas control ( $180.25 \pm 3.89 \mu\text{m}$ ) (**Fig. R14 A y C**). De la misma forma, el tratamiento con el inhibidor de PKCs reduce la elongación axonal ( $138.75 \pm 6.39 \mu\text{m}$  vs  $170.98 \pm 6.39 \mu\text{m}$  en neuronas control) (**Fig. R14 B y C**), bloqueando el efecto de crecimiento axonal descrito para el tratamiento con ADP ( $253.38 \pm 11.48 \mu\text{m}$  vs  $170.98 \pm 6.39 \mu\text{m}$  en neuronas control). Por ello, teniendo en cuenta estos resultados, podemos concluir que PLC y PKCs son efectores “downstream” de P2Y1/ $G_q$  en crecimiento axonal, sin embargo, no explican totalmente la coordinación con los otros receptores.

## 5.2. La actividad de adenilato ciclasas (ACs) es necesaria para promover el crecimiento axonal dependiente de ADP en neuronas de hipocampo en cultivo.

A la luz de estos datos, estudiamos diferentes enzimas señalizadoras que pudieran estar reguladas de forma antagónica con proteínas  $G_q$  y  $G_i$  como posibles dianas responsables de la regulación del crecimiento axonal dependiente de la actividad de los receptores purinérgicos. Un grupo de enzimas que cumple esta premisa son las adenilato ciclasas, que son enzimas que median la formación de AMPc y cuya regulación está ampliamente estudiada (Willoughby and Cooper, 2007). Además, las variaciones locales en los niveles de AMPc, como hemos descrito anteriormente, están relacionadas con la especificación y crecimiento axonal (Shelly et al., 2010); por ello, las enzimas adenilato ciclasas son de gran interés y podrían estar siendo moduladas por los receptores purinérgicos durante el proceso de elongación axonal.

Para estudiar esta hipótesis utilizamos cuatro abordajes experimentales diferentes: **(1)** la inhibición general de adenilato ciclasas con el inhibidor SQ-22536 ( $20 \mu\text{M}$ ); **(2)** la activación de adenilato ciclasas con forskolina ( $5 \mu\text{M}$ ), **(3)** la inhibición de la actividad de PKA, enzima activada por AMPc, con un análogo de AMPc que actúa como antagonista competitivo del AMPc en la activación de esta enzima (cAMPS-Rp,  $20 \mu\text{M}$ ) y un inhibidor selectivo de PKA (H89,  $5 \mu\text{M}$ ) y, finalmente, **(4)** la inhibición selectiva de las fosfodiesterasas 4B y 4D, encargadas de la degradación del AMPc y cuya expresión predomina en cerebro (Iona et al., 1998) utilizando el ácido 3,5-dimetil-1-(3-nitrofenil)-1H-pirazol-4-carboxílico etil éster (inhibidor de PDE4,  $20 \text{ nM}$ ).

Los diferentes tratamientos fueron administrados en neuronas de hipocampo en cultivo mantenidas durante 72 horas de desarrollo en combinación con ADP, los antagonistas de P2Y1 y P2Y13 y un análogo estable del AMPc, el dibutiril AMPc, como control positivo. Posteriormente, las neuronas fueron fijadas y teñidas con marcadores del dominio somatodendrítico y dominio axonal como MAP2 y tau-1, respectivamente, para medir la longitud axonal. Con estas combinaciones podremos analizar si la modificación de la actividad de adenilato ciclasa y su efector PKA, están implicadas en los efectos descritos hasta ahora para los receptores



**Figura R15. El receptor P2Y1 induce un aumento de crecimiento axonal a través de adenilato ciclasa, mientras que el receptor P2Y13 la inhibe para regular negativamente el crecimiento axonal.** Neuronas de hipocampo control y tratadas con ADP (5  $\mu$ M) y MRS-2211 (5  $\mu$ M) en presencia o ausencia de SQ-22536 (20  $\mu$ M) (A) y con MRS-2179 (1  $\mu$ M), forskolina (5  $\mu$ M) y una combinación de ambos (C) hasta las 72h en cultivo y teñidas con MAP2 y Tau-1, para marcar los dominios somatodendrítico y axonal, respectivamente. Barra de escala= 50  $\mu$ m. (B) Cuantificación de la longitud axonal de neuronas tratadas con ADP (5  $\mu$ M) y MRS-2211 (5  $\mu$ M) y dibutilil-AMPC (5  $\mu$ M) en presencia (barras blancas) o ausencia (barras negras) de SQ-22536 (20  $\mu$ M), representada como media  $\pm$  error estándar de 3 experimentos independientes (100 neuronas/condición experimental de cada experimento). \*\*\*  $p < 0.001$ , n.s.= no significativo. La línea gris punteada representa la media de la longitud axonal de las neuronas control. (D) Cuantificación de longitud axonal de neuronas control y tratadas con MRS-2179 (1  $\mu$ M) y de neuronas que sobre-expresan sc shRNA o P2Y1 shRNA en presencia (barras blancas) o ausencia (barras negras) de forskolina (5  $\mu$ M) representadas como media  $\pm$  error estándar de 3 experimentos independientes (100 neuronas/condición experimental de cada experimento). \*\*\*  $p < 0.001$ . La línea gris punteada representa la media de la longitud axonal de las neuronas control.

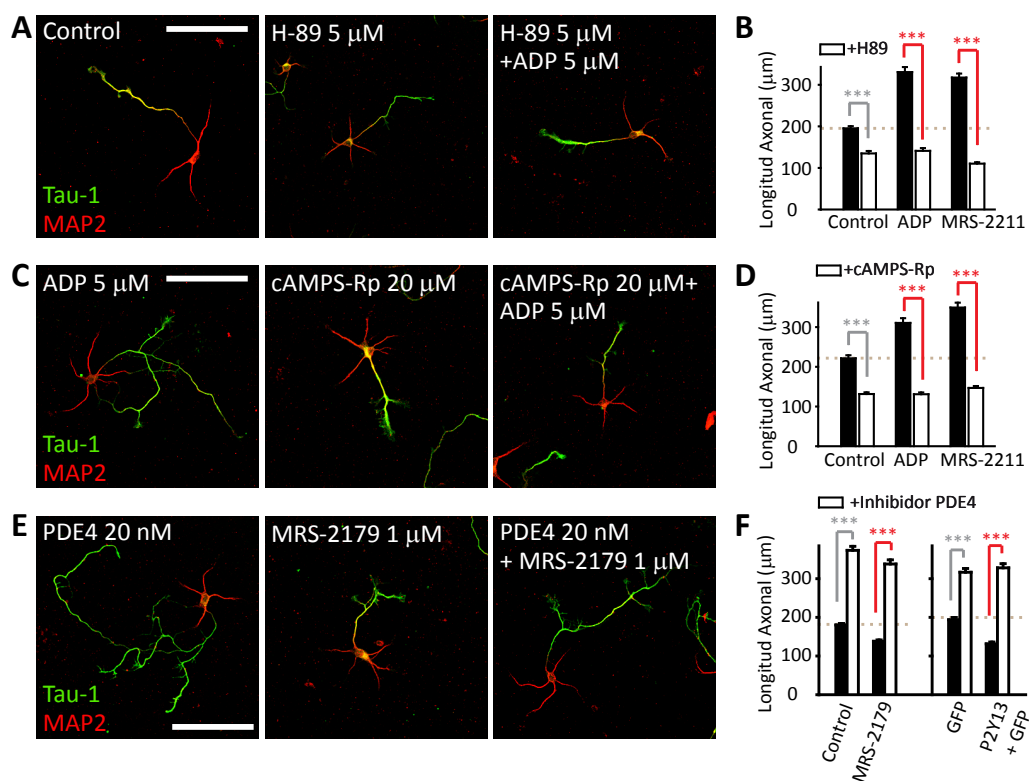
## P2Y1 y P2Y13 en la elongación axonal.

En el primer grupo de experimentos, observamos que la inhibición de ACs con SQ-22536 en presencia de ADP da lugar a una reducción de longitud axonal ( $150.88 \pm 5.07 \mu\text{m}$ ), impidiendo el efecto positivo de crecimiento axonal mediado por ADP ( $362.01 \pm 10.75 \mu\text{m}$  vs  $189.20 \pm 5.58 \mu\text{m}$  en neuronas control) (Fig. R15 A y B). De la misma forma, el tratamiento con SQ-22536 en presencia del antagonista de P2Y13 (MRS-2211) impide el crecimiento axonal inducido por MRS-2211, generando axones con una longitud de  $152.55 \pm 4.43 \mu\text{m}$ , versus  $189.20 \pm 5.58 \mu\text{m}$  en neuronas control, y  $367.86 \pm 10.69 \mu\text{m}$  en neuronas tratadas solo con MRS-2211 (Fig. R15 A y B). Como control interno de este experimento, tratamos neuronas en cultivo con el inhibidor de adenilato ciclasa (SQ-22536) y el análogo del AMPc, dibutilil AMPc. En la figura R15B observamos, como cabía esperar, que la inhibición de adenilato ciclasa no influye en el aumento de longitud axonal inducido por el tratamiento con el análogo del AMPc, dibutilil AMPc ( $298.30 \pm 12.39 \mu\text{m}$  vs  $189.20 \pm 5.58 \mu\text{m}$  en neuronas control).

A continuación, desarrollamos el abordaje contrario, utilizamos forskolina (5  $\mu$ M) como activador general de adenilato ciclasas. En nuestros resultados observamos que el tratamiento con forskolina, y por tanto, el aumento de AMPc intracelular, promueve un incremento significativo de longitud axonal en neuronas de hipocampo ( $264.44 \pm 9.88 \mu\text{m}$ ), con respecto al control ( $156.56 \pm 5.25 \mu\text{m}$ ) (Fig. R15 C y D). Además, este efecto de crecimiento axonal se mantiene en neuronas de hipocampo tratadas con forskolina en combinación con el antagonista de P2Y1, MRS-2179 ( $199.07 \pm 6.81 \mu\text{m}$ ), silenciando el efecto inhibitorio en la regulación del crecimiento axonal mediado por MRS-2179 ( $128.70 \pm 4.68 \mu\text{m}$  vs  $156.56 \pm 5.25 \mu\text{m}$  en neuronas control) (Fig. R15 C y D). Igualmente, el tratamiento con forskolina impide la reducción del crecimiento axonal generado

por la supresión del receptor P2Y1 ( $315.96 \pm 14.04 \mu\text{m}$  vs  $161.90 \pm 6.36 \mu\text{m}$ , en neuronas P2Y1 shRNA positivas) (**Fig. R15D**) o la expresión del receptor P2Y13 (datos no mostrados, ver (del Puerto et al., 2012)). En conclusión, la función de adenilato ciclasas juega un papel importante *downstream* de los receptores P2Y1 y P2Y13 para regular el crecimiento axonal en neuronas de hipocampo en cultivo.

En cuanto a la implicación de la enzima PKA, observamos que su inhibición con H89 (5  $\mu\text{M}$ ), genera axones más cortos con respecto a las neuronas control ( $134.80 \pm 5.94 \mu\text{m}$  vs  $195.19 \pm 5.21 \mu\text{m}$  en neuronas control); e impide el aumento de longitud axonal generado por ADP (5  $\mu\text{M}$ ,  $141.05 \pm 6.69 \mu\text{m}$  vs  $330.60 \pm 12.05 \mu\text{m}$ ) o MRS-2211 (5  $\mu\text{M}$ ,  $110.23 \pm 3.47 \mu\text{m}$  vs  $317.38 \pm 9.60 \mu\text{m}$ ) (**Fig. R16 A y B**). Por otro lado, sabemos que esta enzima se activa por la unión de AMPc a su dominio de regulación, permitiendo la liberación del dominio catalítico. Por ello utilizamos un antagonista competitivo de AMPc (cAMPS-Rp, 20  $\mu\text{M}$ ) que impide la activación de PKA. En los resultados observamos que dicho antagonista, al igual que el tratamiento con H89, reduce la longitud axonal en neuronas de hipocampo en cultivo ( $131.44 \pm 4.25 \mu\text{m}$  vs  $221.38 \pm 7.76 \mu\text{m}$  en



**Figura R16.** El receptor P2Y1 induce un aumento de crecimiento axonal a través del aumento de AMPc y PKA, mientras que el receptor P2Y13 regula negativamente esta vía de señalización. Imágenes representativas de neuronas de hipocampo control y tratadas con ADP (5  $\mu\text{M}$ ) en presencia o ausencia de H89 (5  $\mu\text{M}$ ) (A) o cAMPS-Rp (20  $\mu\text{M}$ ) (C) y con MRS-2179 (1  $\mu\text{M}$ ) en presencia o ausencia de PDE (20 nM) (E). Las neuronas se mantuvieron 72h en cultivo y se tiñeron con MAP2 y Tau-1, para marcar los dominios somatodendrítico y axonal, respectivamente. Barras de escala= 50  $\mu\text{m}$ . Cuantificación axonal de neuronas de hipocampo control y tratadas con ADP (5  $\mu\text{M}$ ) y MRS-2211 (5  $\mu\text{M}$ ) en presencia (barras blancas) o ausencia (barras negras) de H89 (5  $\mu\text{M}$ ) (B) o cAMPS-Rp (20  $\mu\text{M}$ ) (D) representada como media  $\pm$  error estándar de 3 experimentos independientes (100 neuronas/condición experimental de cada experimento). \*\*\*  $p < 0.001$ . La línea gris punteada representa la media de la longitud axonal de las neuronas control. (F) Cuantificación de la longitud axonal de neuronas control o tratadas con MRS-2179 (1  $\mu\text{M}$ ) y neuronas nucleofectadas con un vector control (GFP) o con un vector control y el vector de expresión del receptor P2Y13 (P2Y13 + GFP) cultivadas durante 72h en presencia (barras blancas) o ausencia (barras negras) de PDE (20 nM). En el gráfico se representa la media  $\pm$  error estándar de 3 experimentos independientes (100 neuronas/condición experimental de cada experimento). \*\*\*  $p < 0.001$ . La línea gris punteada representa la media de la longitud axonal de las neuronas control.

neuronas control), y al igual que el tratamiento con H89, impide el incremento de longitud axonal generado por ADP y MRS-2211 (**Fig. R16 C y D**). A la luz de estos experimentos, observamos que los receptores P2Y1 y P2Y13 necesitan la actividad de PKA para regular la elongación axonal.

Para concluir esta serie de experimentos, tratamos neuronas de hipocampo en cultivo con un inhibidor específico de las fosfodiesterasas de tipo 4B y D (inhibidor de PDE4, 20nM), enzimas que degradan AMPc, y observamos que este tratamiento, que impide la degradación de AMPc, promueve el incremento de longitud axonal ( $373.25 \pm 10.39 \mu\text{m}$ ) comparado con neuronas control ( $180.25 \pm 3.89 \mu\text{m}$ ) (**Fig. R16 E y F**). Este tratamiento es capaz de enmascarar el efecto de inhibición del crecimiento axonal promovido por el antagonista de P2Y1 (MRS-2179, 1  $\mu\text{M}$ ), manteniéndose el incremento de longitud axonal en neuronas tratadas con dicho inhibidor en combinación con MRS-2179 ( $337.91 \pm 10.84 \mu\text{m}$  vs  $138.07 \pm 3.57$  en neuronas tratadas solo con MRS-2179). El mismo resultado se obtuvo cuando se trataron neuronas que sobre-expresan P2Y13 (**Fig. R16 E y F**).

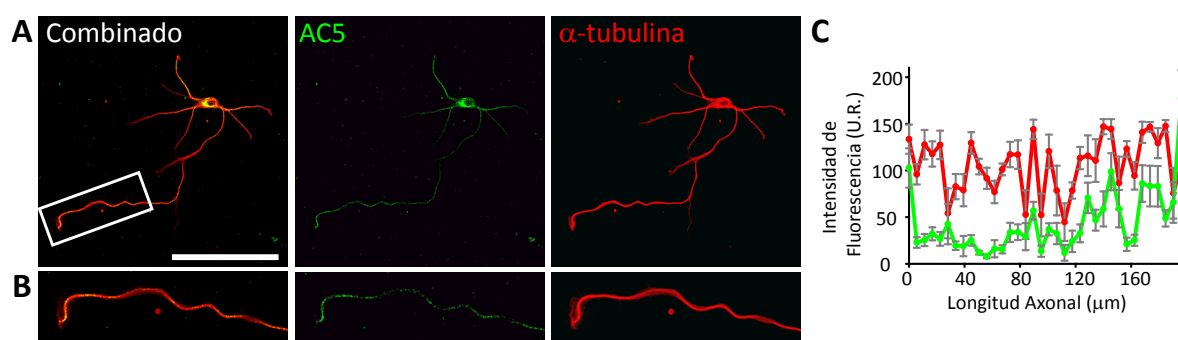
Atendiendo a los resultados obtenidos en este grupo de experimentos, podemos concluir que los receptores purinérgicos P2Y1 y P2Y13 tienen como punto de regulación común la modulación de la actividad de adenilato ciclasa y la síntesis de AMPc, activando la vía de señalización mediada PKA para modular el crecimiento axonal en neuronas de hipocampo en cultivo.

Por último, comprobamos si la disminución de la elongación axonal generada por la expresión del receptor P2X7 podía ser evitada aumentando los niveles de AMPc, y si P2X7 podía también regular la vía de adenilato ciclasa en su modulación del crecimiento axonal. En neuronas que sobre-expresaban el receptor P2X7 modulamos la concentración de AMPc con los tratamientos anteriormente descritos, y observamos que aquellos que promovían un aumento de la concentración de AMPc, tales como Forskolina o el inhibidor de fosfodiesterasas promovían un incremento significativo de longitud axonal en estas neuronas, inhibiendo el efecto negativo observado con la sobre-expresión del receptor P2X7 (datos no mostrados, (del Puerto et al., 2012)). Por tanto, la señalización mediada por adenilato ciclasa coordina la acción de los tres receptores purinérgicos estudiados.

### **5.3. Adenilato ciclasa 5 coordina el proceso de elongación axonal mediado por los receptores P2Y1, P2Y13 y P2X7 en neuronas de hipocampo en cultivo.**

El siguiente objetivo que nos propusimos, fue estudiar si un tipo específico de adenilato ciclasa podría estar mediando los efectos descritos hasta ahora de los receptores purinérgicos durante el desarrollo axonal, así como su modo de regulación por estos receptores. Todas las isoformas de adenilato ciclasa (AC1, 3, 5, 6, 8 y 9) pueden activarse por proteínas  $G_q$  e inhibirse por proteína  $G_i$  (Willoughby and Cooper, 2007). En nuestro estudio hemos observado que estas proteínas G se activan por los receptores P2Y1 y P2Y13, respectivamente. Sin embargo, sólo la actividad de las isoformas 5 y 6 es inhibida por concentraciones sub-micromolares de calcio (0.2-0.6  $\mu\text{M}$ ) (Cooper, 2003; Guillou et al., 1999) como las que se observan al activar el receptor P2X7 en neuronas (Leon et al., 2006). Asimismo, la enzima adenilato ciclasa 5 es capaz de activarse por  $\zeta\text{PKC}$ , que está íntimamente relacionada con la especificación axonal (Schwamborn and Puschel, 2004) y se ha descrito que es capaz de unirse a proteínas  $G_q$  (García-Hoz et al., 2010). Durante el desarrollo experimental observamos que la inhibición de  $\zeta\text{PKC}$  impide la elongación axonal en presencia de ADP, pero no en presencia de forskolina (datos no mostrados, ver (del Puerto et al., 2012)). Por tanto, atendiendo a nuestros resultados previos y a la bibliografía partimos de la hipótesis de que adenilato ciclasa 5 (AC5) pudiera ser el punto de regulación común entre las vías de señalización mediadas por los receptores P2Y1, P2Y13 y P2X7.

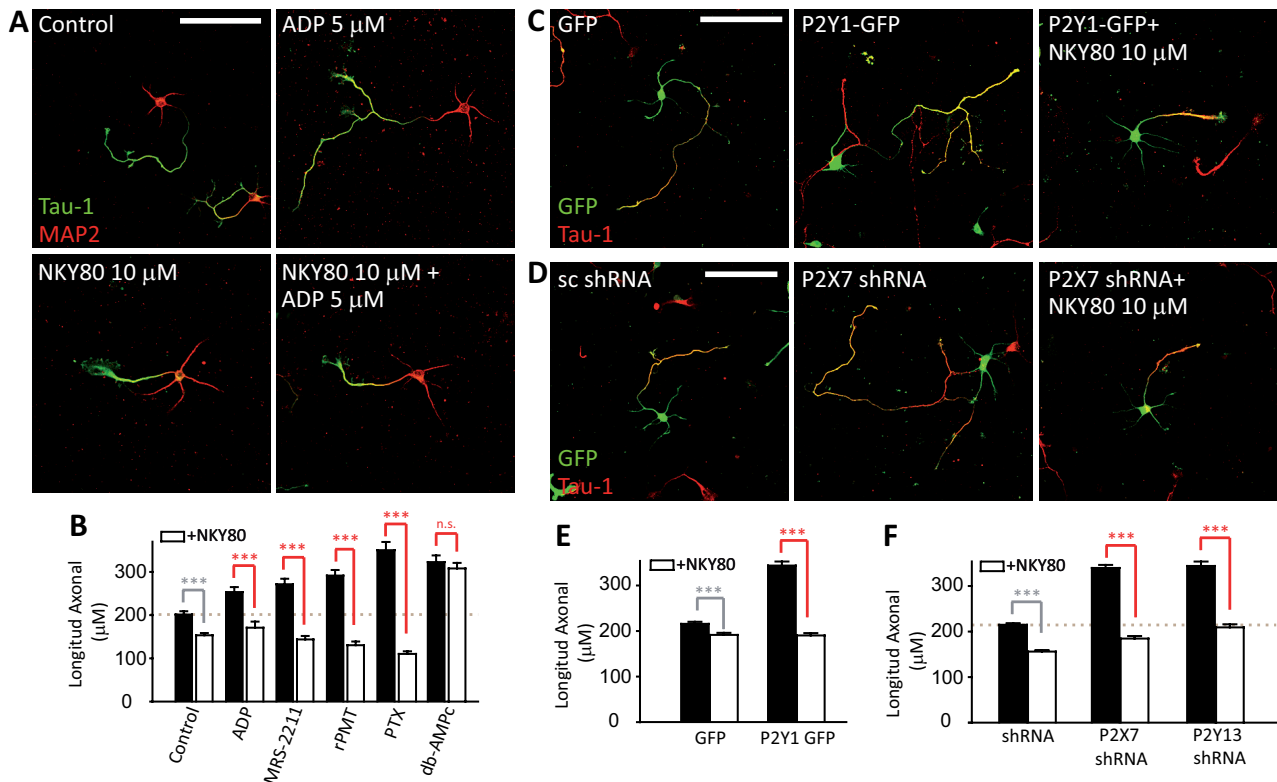
En primer lugar mediante un experimento de inmunocitoquímica analizamos el patrón de expresión de AC5 utilizando un anticuerpo que reconoce esta isoforma. En la imagen observamos que AC5 se localiza en el dominio somatodendrítico y en la zona más distal del axón formando un gradiente creciente (**Fig. R17A**) que tiene el punto de expresión máxima en el cono de crecimiento axonal, como observamos en la ampliación del cono de crecimiento y en la cuantificación de fluorescencia realizada (**Fig. R17 B y C**). Es interesante destacar que este patrón de expresión es similar al que observamos en la expresión de los receptores purinérgicos que estudiamos en esta tesis.



A continuación, para investigar la implicación de la enzima AC5 en la vía de señalización de los receptores purinérgicos dentro del marco de la elongación axonal, utilizamos los siguientes abordajes: (1) un tratamiento con un inhibidor específico de AC5, NKY80 (10  $\mu$ M) (Onda et al., 2001), (2) nucleofecciones con el vector de interferencia de AC5 y (3) cuantificaciones de cambios de AMPc intracelular mediante la técnica de FRET con una sonda fluorescente que responde a cambios en la concentración de AMPc (DiPilato and Zhang, 2009).

En un primer grupo de experimentos tratamos neuronas de hipocampo mantenidas en cultivo durante 24h con el inhibidor específico de AC5 en combinación con agonistas y antagonistas de los receptores en estudio hasta las 72h en cultivo. En la figura R18 A y B, observamos que el tratamiento con el inhibidor de AC5 (NKY80 10  $\mu$ M) provoca el acortamiento de los axones ( $153.31 \pm 5.29 \mu$ m) en relación a las neuronas control ( $170.98 \pm 7.06 \mu$ m), incluso en combinación con ADP (5  $\mu$ M) y el inhibidor de P2Y13 (MRS-2211, 5  $\mu$ M) induce la formación de axones con una longitud similar o inferior a las neuronas control ( $170.92 \pm 14.04 \mu$ m y  $143.76 \pm 8.02 \mu$ m, respectivamente), bloqueando el efecto de crecimiento mediado por los tratamientos con ADP y MRS-2211 ( $253.38 \pm 11.48 \mu$ m y  $271.48 \pm 2.77 \mu$ m, respectivamente) (**Fig. R18 A y B**). Asimismo, el tratamiento con el inhibidor de AC5 también silencia el efecto de crecimiento axonal inducido por la activación de proteínas  $G_q$  (rPMT 20ng) ( $130.34 \pm 8.55 \mu$ m vs  $291.54 \pm 12.96 \mu$ m en neuronas tratadas con rPMT) y la inhibición de proteínas  $G_i$  (PTX 100ng) ( $110.19 \pm 6.14 \mu$ m vs  $350.32 \pm 19.03 \mu$ m en neuronas tratadas con PTX) (**Fig. R18B**). Finalmente, como control interno de este experimento, analizamos el efecto del tratamiento combinado de NKY80 y dibutilil-AMPc (dbcAMP, 5  $\mu$ M), el análogo estable del AMPc. En este caso, como era de esperar, observamos que la combinación de ambos no altera el crecimiento axonal inducido por el db-AMPc ( $308.05 \pm 12.82 \mu$ m vs  $322.73 \pm 15.43 \mu$ m en neuronas tratadas con db-AMPc) (**Fig. R18B**), comprobando que el tratamiento de NKY80 está afectando a los niveles de AMPc.



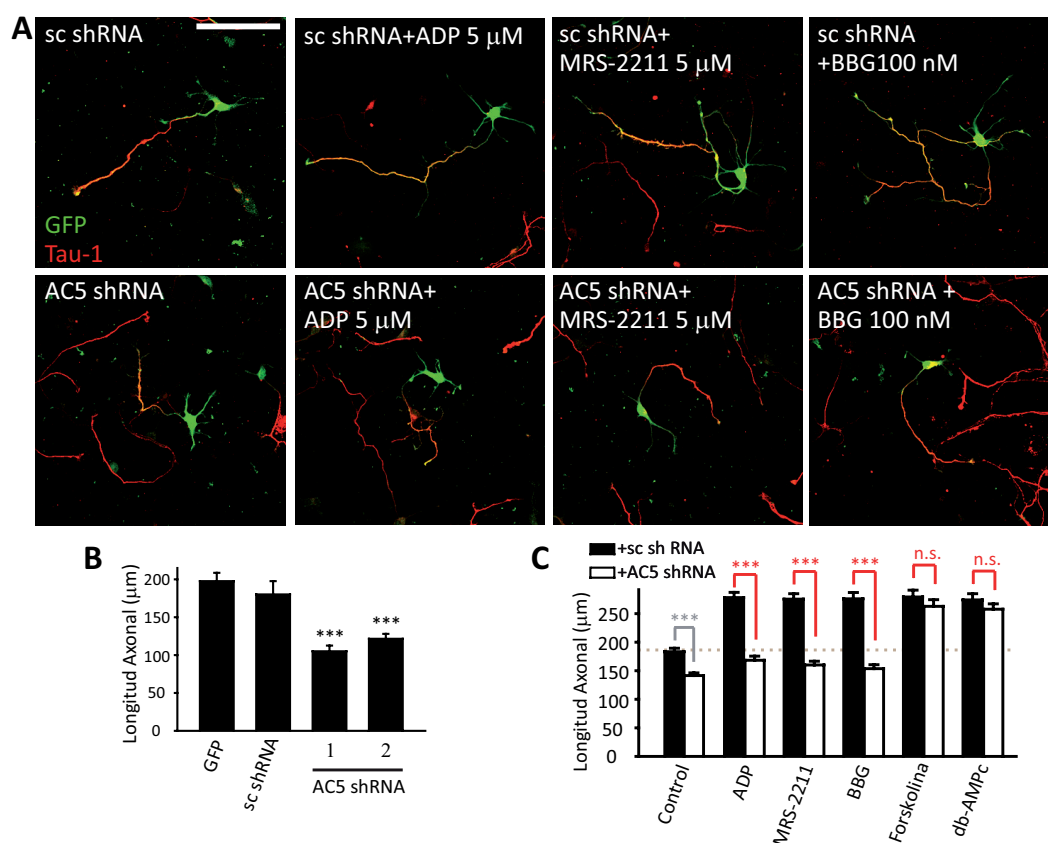


**Figura R18. La inhibición de NKY80 bloquea los efectos producidos por los receptores purinérgicos P2Y1, P2Y13 y P2X7.** (A) Neuronas de hipocampo en cultivo control y tratadas con ADP (5 μM) en presencia (barras blancas) o ausencia (barras negras) de NKY80 hasta 3DIV y teñidas con MAP2 y Tau-1, para marcar los dominios somatodendrítico y axonal, respectivamente. Barras de escala= 50 μm. (B) Cuantificación de la longitud axonal en neuronas control y tratadas con ADP (5 μM), MRS-2211 (5 μM), rPMT (20 ng), PTX (100 ng) y db-AMPC (5 μM), algunas de ellas tratadas con NKY80 (10 μM, barras blancas) y representada como media ± error estándar de 3 experimentos independientes (100 neuronas/condición experimental de cada experimento). \*\*\* p<0.001, n.s.=no significativo. La línea gris punteada representa la media de la longitud axonal de las neuronas control. Neuronas de hipocampo nucleofectadas con un plásmido control (GFP) o el vector de expresión de P2Y1 (P2Y1-GFP) (C) y con el vector de interferencia de P2X7 (P2X7 shRNA) y su vector control (sc shRNA) (D) en presencia o ausencia de NKY80 (10 μM) y mantenidas en cultivo hasta 3 DIV. Se tiñeron con Tau-1 para estudiar la longitud axonal. Barras de escala= 50 μm. (E, F) Cuantificación de la longitud axonal de las neuronas mostradas en C y D y en neuronas nucleofectadas con los vectores de interferencia de P2X7 y P2Y13 (P2X7 shRNA y P2Y13 shRNA, respectivamente) en presencia (barras blancas) o ausencia (barras negras) de NKY80 (10 μM) y representada como media ± error estándar de 3 experimentos independientes (100 neuronas/condición experimental de cada experimento). \*\*\* p<0.001. La línea gris punteada representa la media de la longitud axonal de las neuronas control.

A continuación utilizando este mismo inhibidor, hicimos un abordaje paralelo utilizando vectores de expresión y de interferencia de los receptores purinérgicos. Las neuronas hipocámpales fueron nucleofectadas en el momento previo al plaqueo y tras 24h en cultivo fueron tratadas con dicho inhibidor hasta las 72h. Finalmente se tiñeron inmunocitoquímicamente con un marcador axonal (Tau-1) y se cuantificó la longitud de los axones de las neuronas GFP positivas con el programa NeuronJ. En la figura R18C observamos que el tratamiento con NKY80 promueve una reducción de longitud axonal en neuronas de hipocampo en cultivo que sobreexpresan el receptor P2Y1 ( $190.26 \pm 5.25 \mu\text{m}$  vs  $343.74 \pm 8.93 \mu\text{m}$  en neuronas control que expresan P2Y1 GFP) (Fig. R18 C y E) y en neuronas que expresan vectores de interferencia del receptor P2Y13 (P2Y13 shRNA) ( $209.20 \pm 6.76 \mu\text{m}$  vs  $344.09 \pm 9.67 \mu\text{m}$  en neuronas control que expresan P2Y13 shRNA), o bien el interferente del receptor P2X7 (P2X7 shRNA) ( $184.58 \pm 5.64 \mu\text{m}$  vs  $339.64 \pm 6.74 \mu\text{m}$  en neuronas control que expresan P2X7shRNA) (Fig. R18 D y F). Por tanto, en vista de estos resultados, sabemos que la inhibición de AC5 en neuronas de hipocampo en cultivo bloquea el incremento de crecimiento promovido por cambios en la actividad y expresión de los receptores P2Y1, P2Y13 y P2X7.

Como segundo abordaje, nucleofectamos dos vectores de interferencia que silencian la expresión de AC5

(AC5 shRNA) de forma específica en neuronas de hipocampo en cultivo tras su nucleofección. Pasadas 24h de expresión tratamos estas neuronas con ADP (5  $\mu$ M) y los antagonistas de P2Y13 (MRS-2211, 5  $\mu$ M) y P2X7 (BBG, 100 nM) y analizamos el crecimiento axonal de las neuronas GFP positivas a las 72 horas. En la figura R19B observamos que, al igual que ocurre con el tratamiento con NKY80, las neuronas que expresan estas dos secuencias diferentes de interferencia de AC5 presentan axones más cortos ( $105.01 \pm 7.51 \mu$ m y  $121.50 \mu$ m) con respecto a las neuronas control y aquellas que expresan un ARN de interferencia control o *scrambled* ( $197.60 \pm 11.00 \mu$ m y  $180.06 \pm 17.54 \mu$ m, respectivamente). Asimismo, la supresión de AC5 impide el aumento de elongación axonal que generan los tratamientos con ADP, MRS-2211 y BBG, dando lugar a axones más cortos ( $164.31 \pm 7.24 \mu$ m,  $160.07 \pm 6.60 \mu$ m y  $153.66 \pm 6.92 \mu$ m, respectivamente) que en neuronas control (*scrambled* shRNA) tratadas con estos mismos compuestos ( $278.14 \pm 9.15 \mu$ m,  $275.37 \pm 9.56 \mu$ m y  $275.97 \pm 11.01 \mu$ m, respectivamente) (Fig. R19 A y C). Como control interno tratamos neuronas electroporadas con el interferente de AC5 con el activador general de adenilato ciclasas, Forskolina (5  $\mu$ M), y el análogo estable de AMPc, dbAMPc. En ambos casos las neuronas presentan un incremento significativo de

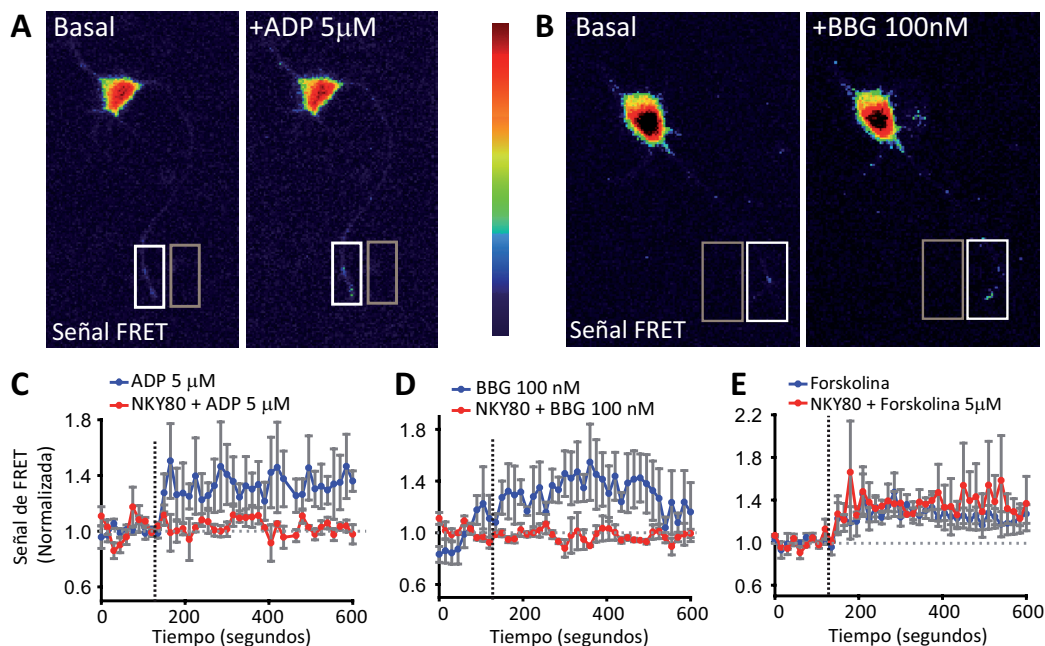


**Figura R19. La supresión de AC5 bloquea los efectos producidos por los receptores purinérgicos P2Y1, P2Y13 y P2X7.** (A) Imágenes representativas de neuronas nucleofectadas con el vector de interferencia de AC5 (AC5 shRNA) y su plásmido control (sc shRNA), algunas de ellas tratadas con ADP (5  $\mu$ M), MRS-2211 (5  $\mu$ M) y BBG (100 nM) (barras blancas). Tras 72h en cultivo las neuronas se tiñeron con Tau-1 para analizar la longitud axonal. Barra de escala= 50  $\mu$ m. (B) Cuantificación de la longitud axonal en neuronas nucleofectadas con dos secuencias de interferencia de AC5 (AC5 shRNA 1 y 2), su vector control (sc shRNA) y un plásmido GFP representada como media  $\pm$  error estándar de 3 experimentos independientes (100 neuronas/condición experimental de cada experimento). \*\*\*  $p < 0.001$ . (C) Cuantificación de la longitud axonal de neuronas nucleofectadas con el vector de interferencia de AC5 (barras blancas) o el plásmido control (barras negras) y cultivadas en presencia de los tratamientos mostrados en A o forskolina (5  $\mu$ M) y db-AMPC (5  $\mu$ M). Representación de la media  $\pm$  error estándar de 3 experimentos independientes (100 neuronas/condición experimental de cada experimento). \*\*\*  $p < 0.001$ , n.s.= no significativo. La línea gris punteada representa la media de la longitud axonal de las neuronas control.

la longitud axonal ( $262.82 \pm 11.69 \mu\text{m}$  y  $257.73 \pm 9.42 \mu\text{m}$ , respectivamente) debido al incremento de AMPc en las neuronas mediado por otras ACs o al análogo estable (**Fig. R19C**). Estos resultados con el vector de interferencia de AC5, apoyan los datos obtenidos con su antagonista específico, NKY80.

Finalmente, analizamos los cambios relativos de concentración intracelular de AMPc en neuronas de hipocampo en cultivo. Para ello hicimos un seguimiento *in vivo* de la concentración de AMPc utilizando una sonda de FRET que detecta AMPc. Pasados 150 segundos de registros en condiciones control, se añadieron los siguientes tratamientos: ADP ( $5 \mu\text{M}$ ) y BBG ( $100 \text{ nM}$ ), además de forskolina ( $5 \mu\text{M}$ ) como control, en presencia o ausencia del inhibidor de AC5 (NKY80,  $10 \mu\text{M}$ ). En los resultados observamos que, tanto la activación de P2Y1 con ADP, como la inhibición de P2X7 con BBG, generan un incremento de los niveles de AMPc de un 30-40% comparado con el valor normalizado previo al tratamiento (**Fig. R20 A y C, y B y D**, respectivamente), que en ambos casos es bloqueado por la inhibición de AC5 con NKY80; es decir, el incremento de AMPc es dependiente exclusivamente de AC5. Finalmente, la activación general de adenilato ciclasas con forskolina induce un incremento de AMPc que se mantiene incluso en presencia del inhibidor de AC5 (NKY80) (**Fig. R20E**).

Todos estos datos confirman que los receptores purinérgicos (P2Y1, P2Y12 y P2X7) influyen en el desarrollo axonal a través de cambios en la concentración de AMPc gracias a la regulación coordinada de la actividad de AC5 en neuronas de hipocampo en cultivo.



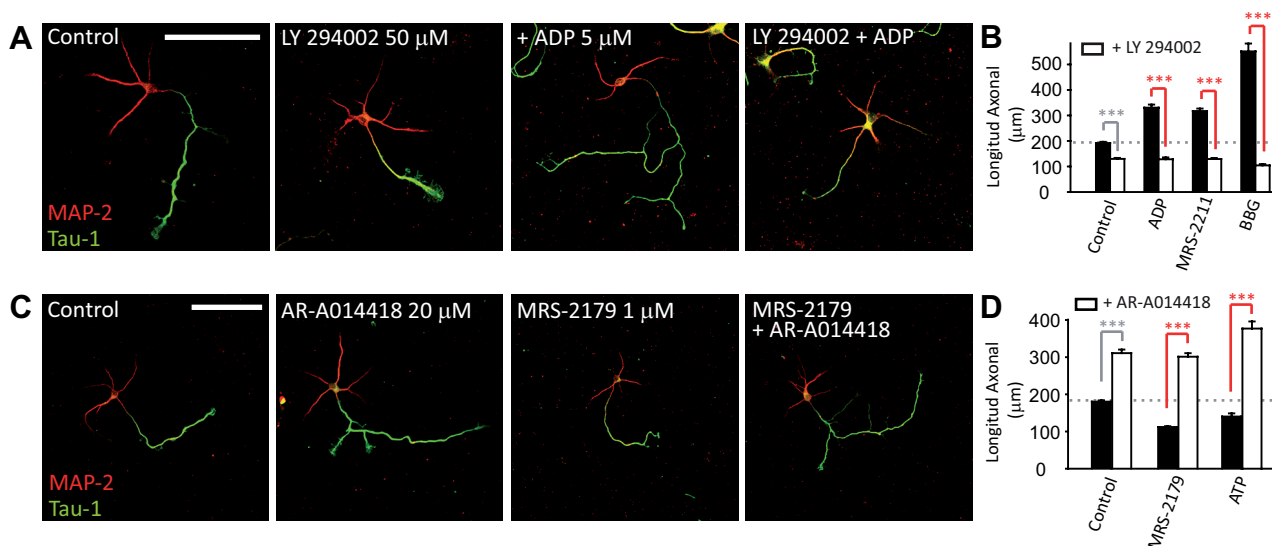
**Figura R20. La inhibición de AC5 bloquea el incremento de AMPc observado en el cono de crecimiento axonal tras un tratamiento con ADP o BBG.** (A, B) Neuronas hipocámpales nucleofectadas con una construcción de FRET que contiene el biosensor de AMPc ICUE3. Tras 2 DIV las neuronas fueron tratadas con ADP ( $5 \mu\text{M}$ ) (A) o BBG ( $100 \text{ nM}$ ) (B) tras 150 segundos de registro de la línea basal y procesadas como se describe en el apartado 12 de Materiales y Métodos. Las imágenes de pseudocolor muestran las señales de FRET obtenidas en estas neuronas antes y después de la adición de ADP y BBG. Las imágenes de pseudocolor fueron obtenidas usando el software Adobe Photoshop CS4. Los rectángulos blancos muestran el área analizada mientras que los grises el área donde se extrajo la señal de fondo. (C, D, E) Los gráficos representan la media  $\pm$  sem de la señal de FRET (CFP/YFP) en 4 neuronas diferentes tratadas con ADP ( $5 \mu\text{M}$ ) (C), BBG ( $100 \text{ nM}$ ) (D) y forskolina ( $5 \mu\text{M}$ ) (E) en presencia (rojo) o ausencia (azul) de NKY80 ( $5 \mu\text{M}$ ). La línea de puntos negra indica el momento en el que se añade el ADP, BBG y la forskolina al medio. El tratamiento con NKY80 se añade desde el momento inicial en las neuronas correspondientes. La línea de puntos gris muestra la línea basal de experimento.



#### 5.4. La acción coordinada de P2Y1, P2Y13 y P2X7 regula el crecimiento axonal a través de la modulación de la vía de PI3K/Akt/GSK3.

El proceso de especificación y elongación axonal es un proceso ampliamente estudiado, que está regulado por diferentes vías de señalización, entre las que destaca la vía de señalización de PI3K/AKT/GSK3. Como hemos descrito en la introducción, la actividad de PI3K es necesaria para la especificación y el crecimiento axonal (Shi et al., 2003); asimismo, la inhibición de GSK3 tras la especificación axonal, promueve el incremento en la longitud y ramificación axonal en neuronas de hipocampo en cultivo (Garrido et al., 2007). Una vez analizados nuestros resultados, quisimos estudiar si los receptores P2Y1, P2Y13 y P2X7 podían modular la vía de PI3K/AKT/GSK3, a través de la regulación coordinada de AC5, para finalmente modular el crecimiento axonal en neuronas de hipocampo en cultivo.

Para estudiar esta hipótesis analizamos la longitud axonal en neuronas de hipocampo en cultivo tratadas con agonistas y antagonistas de receptores purinérgicos en presencia o ausencia de inhibidores específicos de PI3K (LY-294002, 10  $\mu$ M) y de GSK3 $\alpha/\beta$  (AR-A014418, 20  $\mu$ M). En la figura R21 A y B observamos que la inhibición de PI3K (50  $\mu$ M) en neuronas hipocampales en combinación con ADP (5  $\mu$ M) o MRS-2211 (5  $\mu$ M) bloquea el efecto positivo sobre la elongación axonal de ambos compuestos y genera neuronas con axones más cortos ( $128.32 \pm 7.18 \mu$ m y  $129.28 \pm 4.09 \mu$ m, respectivamente vs  $195.19 \pm 5.21 \mu$ m en neuronas control), Por el contrario, la reducción en la longitud axonal generada por la inhibición del receptor de P2Y1 con MRS-2179 (1  $\mu$ M) se evita al co-tratar las neuronas con el inhibidor de GSK3 $\alpha/\beta$  (Fig. R21 C y D), generando un incremento de la elongación axonal ( $301.21 \pm 9.54 \mu$ m vs  $179.85 \pm 3.64 \mu$ m en neuronas control). En el caso del receptor P2X7, el tratamiento combinado con el inhibidor de PI3K y su antagonista (BBG, 5  $\mu$ M) induce una reducción significativa de longitud axonal ( $104.20 \pm 5.16 \mu$ m) en neuronas hipocampales en relación a las neuronas tratadas solo con BBG ( $551.20 \pm 30.70 \mu$ m) (Fig. R21B). Por otro lado, el tratamiento combinado con ATP (+1 mM) y el inhibidor de GSK3 $\alpha/\beta$  induce la formación de neuronas con axones más largos ( $376.95$

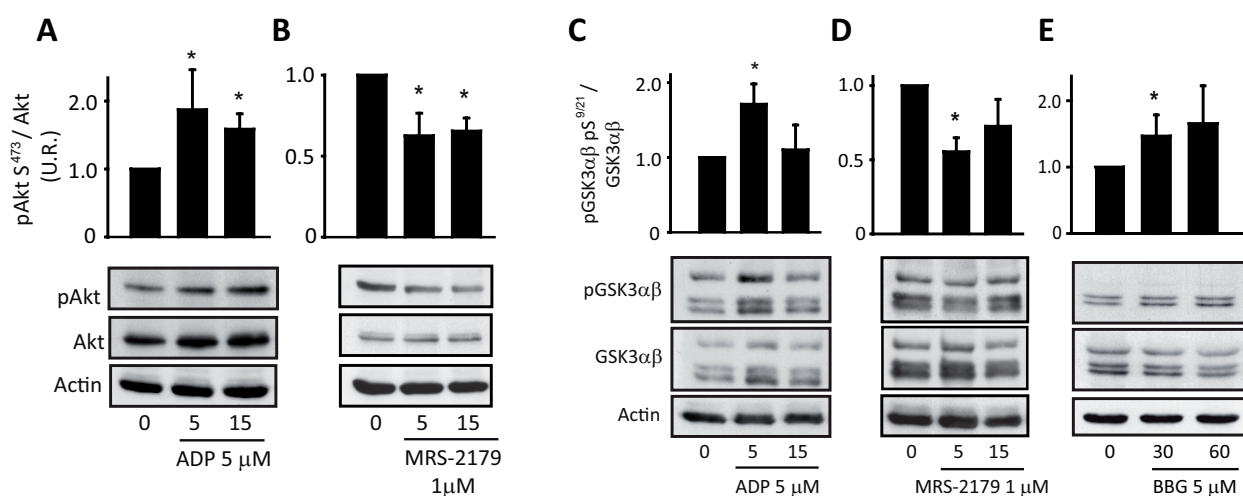


**Figura R21. Los efectos producidos en elongación axonal por los receptores P2Y1, P2Y13 y P2X7 están mediados por la vía de PI3K/AKT/GSK3 $\alpha/\beta$ .** (A, C) Imágenes representativas de neuronas de hipocampo de 3 DIV tratadas con ADP (5  $\mu$ M) en presencia o ausencia de LY-294002 (50  $\mu$ M) (A) o tratadas con MRS-2179 (1  $\mu$ M) en presencia o ausencia de AR-A014418 (20  $\mu$ M) (C). Las neuronas se tiñeron con MAP2 y Tau-1, para marcar los dominios somatodendrítico y axonal, respectivamente. Barras de escala= 50  $\mu$ m. (B, D) Cuantificación de la longitud axonal en neuronas de 3 DIV control o tratadas con ADP (5  $\mu$ M), MRS-2211 (5  $\mu$ M) y BBG (5  $\mu$ M) en presencia (barras blancas) o ausencia (barras negras) de LY-294002 (50  $\mu$ M) (B) o en neuronas tratadas con MRS-2179 (1  $\mu$ M) o ATP (1 mM) (D) en presencia (barras blancas) o ausencia (barras negras) de AR-A014418 (20  $\mu$ M). Ambas cuantificaciones se representan como media  $\pm$  error estándar de 3 experimentos independientes (100 neuronas/condición experimental de cada experimento). \*\*\*  $p < 0.001$ . Las líneas grises punteadas representan la media de la longitud axonal de las neuronas control.

$\pm 19.11 \mu\text{m}$ ), bloqueando el efecto de reducción axonal promovido por el tratamiento con dicho agonista ( $140.34 \pm 8.49 \mu\text{m}$  vs  $182.47 \pm 9.74 \mu\text{m}$  en neuronas control) (**Fig. R21D**).

Finalmente, utilizamos la técnica de Western-blot en extractos de neuronas de hipocampo cultivadas durante 48h. Con este abordaje estudiamos las variaciones en el estado de fosforilación de AKT y GSK3 $\alpha/\beta$  tras la aplicación de agonistas y antagonistas de los receptores estudiados, mantenidos a diferentes tiempos. En los resultados observamos que la activación del receptor P2Y1 con ADP (5  $\mu\text{M}$ ) promueve un incremento significativo en la fosforilación de la serina 473 de AKT y por tanto su activación (**Fig. R22A**); mientras que el tratamiento con su antagonista (MRS-2179) produce el efecto contrario (**Fig. R22B**). Además, el tratamiento con ADP promueve un incremento de la fosforilación de GSK3 en las serinas 9/21, inhibiendo dicha enzima (**Fig. R22C**). Esta inhibición de GSK3 ha sido relacionada previamente con la inducción del crecimiento axonal en neuronas hipocampales (Garrido et al., 2007) como el que observamos con el tratamiento con ADP. En el caso del tratamiento con el antagonista de P2Y1, MRS-2179, observamos el efecto contrario, un descenso de la fosforilación de GSK3 (**Fig. R22D**). Finalmente, el tratamiento de las neuronas con el antagonista del receptor P2X7 supone un incremento de dicha fosforilación de GSK3 (**Fig. R22E**), que se traduce en el incremento de longitud axonal observado.

Una vez analizados estos resultados podemos concluir que los receptores purinérgicos regulan de manera coordinada la concentración de AMPc gracias a la regulación de la actividad de AC5. Estas variaciones en la concentración de AMPc, suponen la modulación de la vía de PI3K-AKT-GSK3 que en último término regula el proceso de elongación axonal en neuronas hipocampales. Más concretamente, el ADP, a través del receptor P2Y1, induce la activación de AC5, el aumento de AMPc y finalmente la activación de la vía de PI3K/AKT/GSK3



**Figura R22. Los receptores P2Y1 y P2X7 modifican el estado de fosforilación de AKT y GSK3 en neuronas de hipocampo en cultivo.** (A, B) Cuantificación de la fosforilación de AKT en la serina 473 en extractos de neuronas hipocampales tratadas con ADP (5  $\mu\text{M}$ ) (A) y MRS-2179 (1  $\mu\text{M}$ ) (B) durante 5 o 15 minutos. (C, D) Cuantificación de la fosforilación GSK3 $\alpha/\beta$  en las serinas 9/21 en extractos de neuronas hipocampales tratadas con ADP (5  $\mu\text{M}$ ) (C) y MRS-2179 (1  $\mu\text{M}$ ) (D) durante 5 o 15 minutos. (E) Cuantificación de la fosforilación GSK3 $\alpha/\beta$  en las serinas 9/21 en extractos de neuronas hipocampales tratadas con BBG (5  $\mu\text{M}$ ) durante 30 o 60 minutos. Todos los gráficos representan la media  $\pm$  sem de 3 experimentos diferentes. \* $p < 0.05$  (t-test). Se muestran imágenes representativas de Western-blot de cada experimento bajo cada gráfico.

que promueve el crecimiento axonal observado. Este proceso es controlado y modulado negativamente por el receptor P2Y13. Finalmente, una alta concentración de ATP en el medio extracelular, induce un incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular a través de la activación de los receptores P2X7 neuronales, que supone la inhibición de AC5, menor concentración de AMPc y menor actividad de PKA. Directa o indirectamente, esta cascada modula la actividad de la vía de PI3K/AKT/GSK3, regulando de forma negativa (ATP/P2X7) o positiva (ADP/P2Y1) el crecimiento axonal.

## 6. IMPLICACIÓN DEL RECEPTOR P2X7 EN EL MANTENIMIENTO Y PLASTICIDAD DEL SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN (SIA) EN CONDICIONES PATOLÓGICAS.

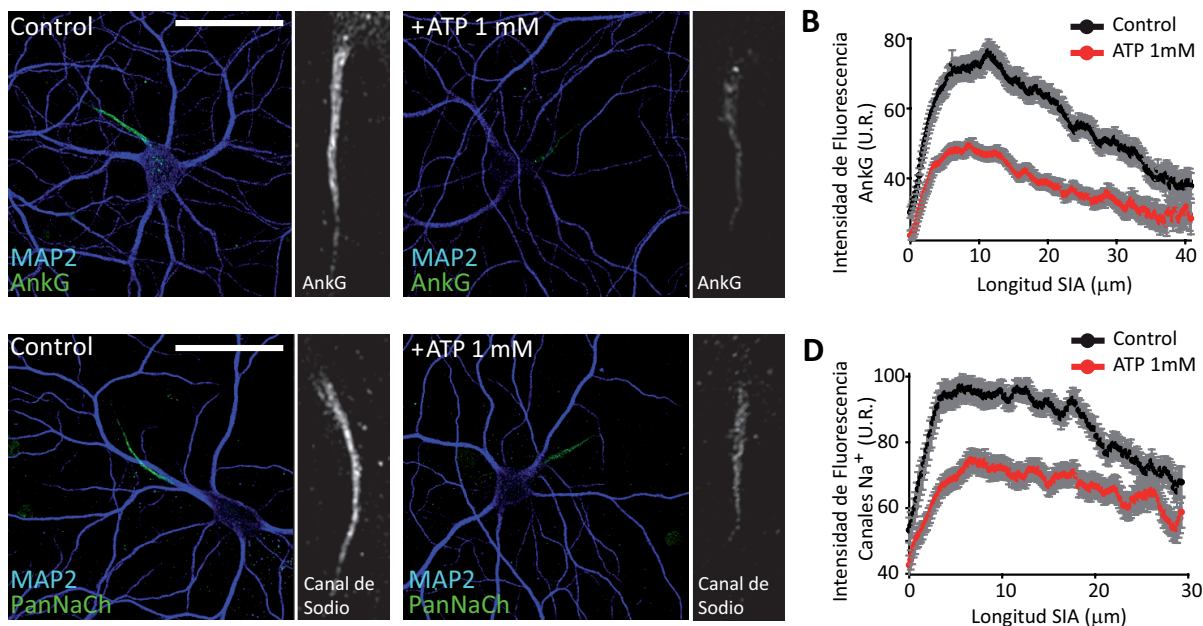
Llegados a este punto, hemos descrito la implicación de los receptores purinérgicos durante el proceso de elongación axonal, que tiene lugar en las primeras etapas del desarrollo de las neuronas hipocampales. A continuación, quisimos estudiar si estos receptores tienen alguna relevancia en etapas posteriores de desarrollo, participando en procesos como el mantenimiento de la polaridad neuronal y la excitabilidad en nuestro modelo de cultivo. Por ello, nos planteamos como objetivo el estudio de la implicación del receptor P2X7 en el mantenimiento y estabilidad del segmento inicial del axón (SIA) en condiciones patológicas, por su implicación en procesos de neuroinflamación. El SIA, como detallamos en la introducción, es un dominio neuronal cuyas funciones principales son la generación de potenciales de acción y el mantenimiento de la polaridad neuronal. El SIA forma un complejo compuesto por proteínas de anclaje, canales iónicos, componentes del citoesqueleto y de la matriz extracelular, siendo la proteína ankirina G el elemento primario al que se anclan el resto de componentes, entre ellos los canales de sodio dependientes de voltaje (revisado en (Rasband, 2010)).

En condiciones patológicas, tales como procesos de isquemia, el SIA se desensambla debido a la liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  en la zona dañada, que provoca la degradación de sus componentes, como ank G,  $\beta\text{IV}$ -espectrina o canal de  $\text{Na}^{+}$  de una forma calpaína-dependiente (Schafer et al., 2009). Asimismo, sabemos que el receptor P2X7 está implicado en múltiples patologías, entre ellas la isquemia, y que su inhibición previene la excitotoxicidad neuronal mediada por ATP y reduce el daño cerebral (Arbeloa et al., 2012). Atendiendo a estas premisas, nos planteamos la hipótesis de que el receptor P2X7 pudiera estar mediando el daño descrito en el SIA en condiciones patológicas, de una forma  $\text{Ca}^{+2}$  dependiente, modificando las propiedades electrofisiológicas relacionadas con el SIA en las neuronas de la zona dañada.

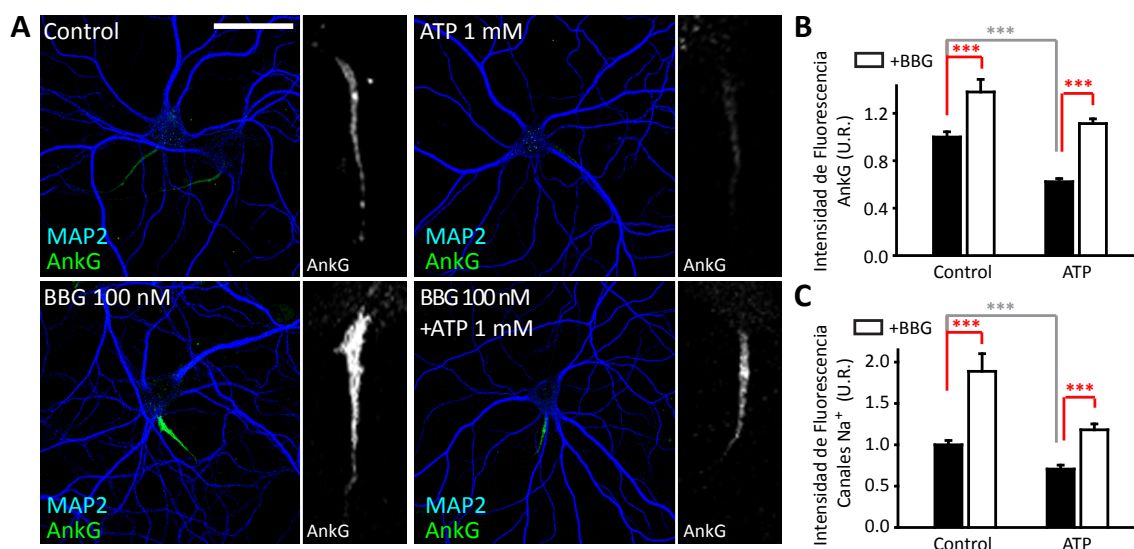
### 6.1. La activación del receptor P2X7 disminuye la expresión de ankirina G y canales de $\text{Na}^{+}$ dependientes de voltaje en el SIA.

Para analizar los efectos de la actividad del receptor P2X7 en el mantenimiento de la integridad del SIA, mantuvimos neuronas en cultivo durante 20 días y durante las últimas 24 horas incrementamos la concentración de ATP en el medio extracelular (+1 mM). A continuación se fijaron las neuronas y se realizaron tinciones inmunocitoquímicas con anticuerpos dirigidos contra ankirina G y canales de sodio dependientes de voltaje, además de MAP2 (marcador del dominio somatodendrítico). Las imágenes se adquirieron utilizando los mismos parámetros para poder cuantificar la intensidad de fluorescencia de cada marcaje (**Fig. R23 A y C**). La cuantificación de la intensidad de fluorescencia de ambas proteínas del SIA se realizó utilizando el programa MATLAB (**Fig. R23 B y D**). En la figura R23 A y B observamos que el tratamiento con ATP (1mM) provoca un descenso en la intensidad de fluorescencia de ankirina G de aproximadamente un 38% con respecto a las neuronas control a lo largo del SIA. De la misma forma, observamos un descenso similar (30%) en la intensidad de fluorescencia a lo largo del SIA de canales de  $\text{Na}^{+}$  en neuronas tratadas con ATP (+ 1 mM) con respecto a neuronas control (**Fig. R23 C y D**). En ningún caso encontramos diferencias en cuanto a la longitud del SIA o su localización con respecto al soma.

En la misma línea de investigación, analizamos la expresión de ankirina G y canales de  $\text{Na}^{+}$  en neuronas hipocampales tratadas con ATP (+ 1 mM) en presencia o ausencia del antagonista del receptor P2X7, BBG (100nM) durante 24h. En las imágenes obtenidas con microscopia confocal (**Fig. R24A**) observamos que el bloqueo del receptor P2X7 impide la pérdida de intensidad de fluorescencia de ankirina G en el SIA ( $1.11 \pm$



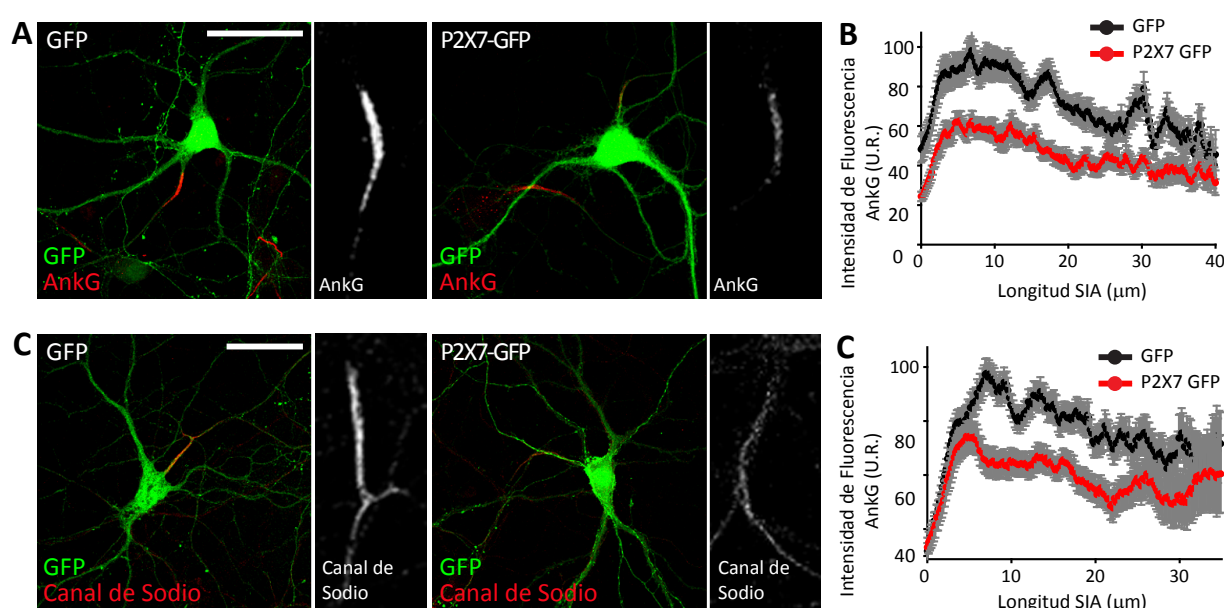
0.04 U.R. en neuronas ATP + BBG vs  $0.62 \pm 0.03$  U.R. en neuronas tratadas con ATP). De hecho, el tratamiento con BBG por sí solo provoca un incremento significativo en su expresión en neuronas de hipocampo en cultivo ( $1.38 \pm 0.1$  U.R. vs  $1 \pm 0.04$  en neuronas control), como observamos en las figuras R24 A y B. En el caso de





los canales de Na<sup>+</sup> obtenemos un resultado similar ( $1.18 \pm 0.07$  U.R. en neuronas tratadas con ATP+BBG vs  $0.70 \pm 0.04$  U.R. en neuronas tratadas con ATP), como observamos en la cuantificación de la figura R24C. Por tanto, a la luz de estos resultados podemos concluir que el ATP, a través de la activación del receptor P2X7 está promoviendo un descenso de la expresión de ankirina G y canales de sodio en el SIA de neuronas hipocampales.

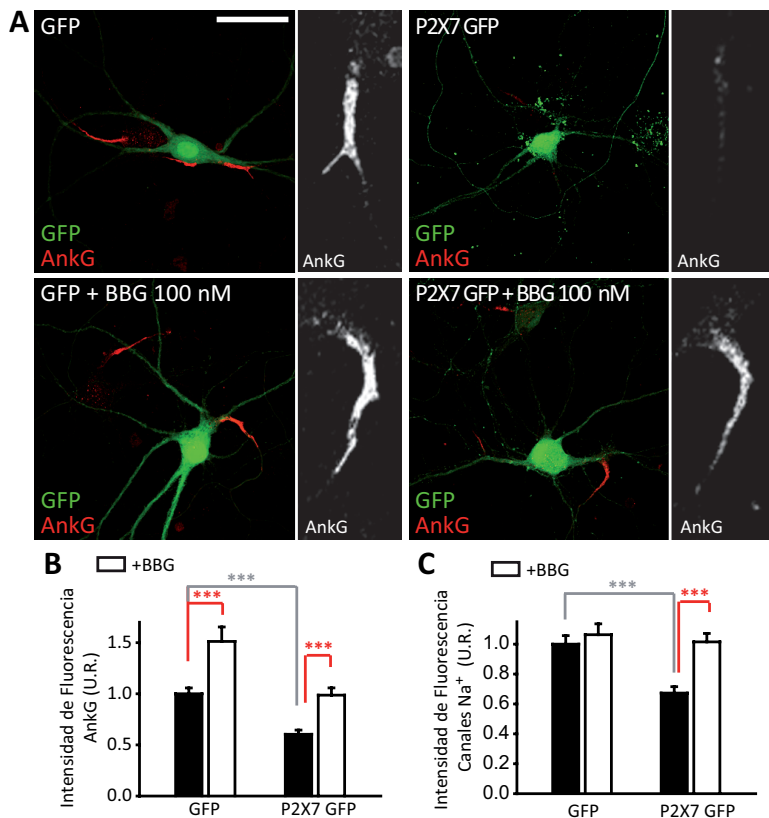
Para confirmar la implicación del receptor P2X7, utilizamos un segundo abordaje paralelo, en el que nucleofectamos neuronas de hipocampo en cultivo con el vector de expresión del receptor P2X7 activo (P2X7-GFP). En las imágenes observamos que la sobre-expresión de P2X7 provoca un descenso en la expresión de ankirina G (**Fig. R25A**) de aproximadamente un 40% (**Fig. R25B**), similar a la que observamos con el tratamiento con ATP. Del mismo modo, estas neuronas también presentan un descenso en la expresión de canales de Na<sup>+</sup> (**Fig. R25C**) de un 20% aproximadamente (**Fig. R25D**).



**Figura R25. La expresión exógena del receptor P2X7 reduce la concentración de ankirina G y canales de sodio en el SIA.** (A, C) Neuronas hipocampales de 20 DIV nucleofectadas con GFP o con el vector de expresión del receptor P2X7 (P2X7-GFP) y teñidas con ankirinaG (rojo) (A) o canal de sodio (rojo) (C). Barras de escala= 50 μm. A la derecha de cada imagen se muestran ampliaciones (3x) de ankirina G o canal de sodio del SIA analizado. Todas las imágenes se obtuvieron manteniendo constantes las condiciones de exposición en un microscopio confocal (Materiales y Métodos). (B, D) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de ankirina G (B) y canal de sodio (D) a lo largo del SIA en neuronas GFP (negro) y P2X7-GFP positivas (rojo) y representada como la media (U. R.) ± error estándar de 3 experimentos independientes (30 neuronas/condición experimental de cada experimento).

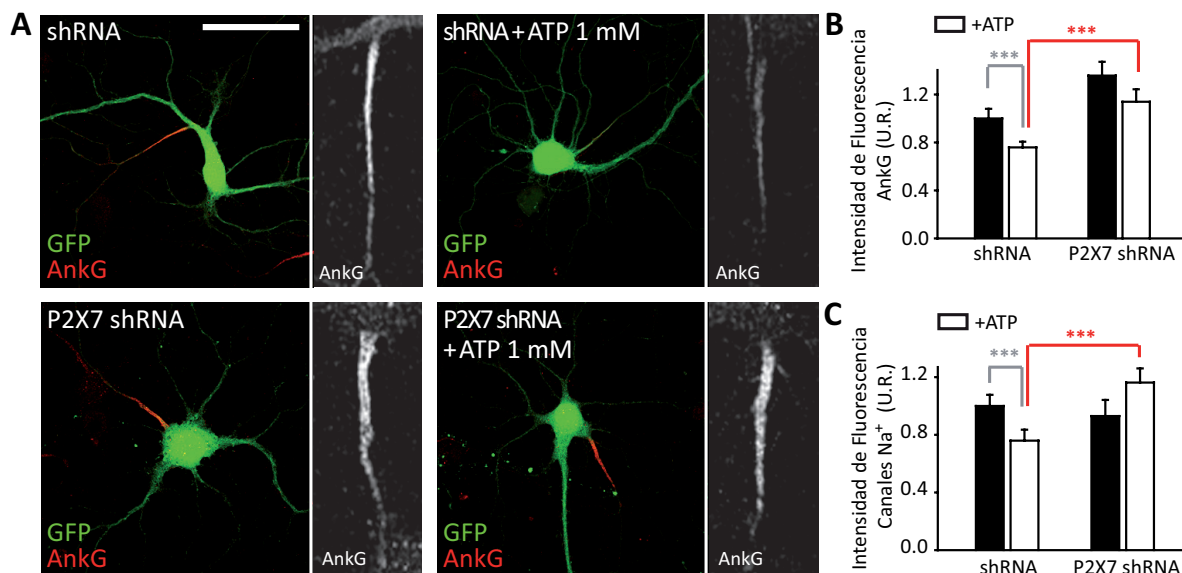
Finalmente, en neuronas que sobre-expresan el receptor P2X7 hicimos un tratamiento de 24h con BBG para bloquear el receptor. En la figura R26A observamos que la intensidad de fluorescencia de ankirina G se recupera en las neuronas que expresan P2X7 y que posteriormente han sido tratadas con BBG ( $0.99 \pm 0.07$  U.R.), a diferencia de las no tratadas ( $0.60 \pm 0.04$  U.R.) (**Fig. R26B**). El mismo resultado observamos analizando la expresión de canales de sodio, en neuronas que sobre-expresan el receptor P2X7, donde el tratamiento con BBG provoca un incremento en su intensidad de fluorescencia ( $1.01 \pm 0.06$  U.R.), comparado con neuronas P2X7-GFP positivas no tratadas ( $0.67 \pm 0.04$  U.R.) (**Fig. R26C**).

Por otro lado, como abordaje complementario, nucleofectamos neuronas hipocampales con el vector de interferencia del receptor P2X7 (P2X7 shRNA). Pasados 20 días en cultivo, tratamos dichas neuronas con ATP (+ 1 mM). En neuronas nucleofectadas con el vector control, el tratamiento con ATP promueve un descenso



**Figura R26. La inhibición del receptor P2X7 recupera y aumenta la expresión de ankirinaG y canales de sodio en el SIA en neuronas que sobre-expresan el receptor P2X7.** (A) Imágenes representativas de neuronas hipocámpales de 20 DIV nucleofectadas con un plásmido control (GFP) y el vector de expresión de P2X7 (P2X7-GFP). Algunas de ellas fueron tratadas con BBG (100 nM). Las neuronas se tiñeron con ankirinaG (rojo). Barra de escala= 50  $\mu$ m. A la derecha de cada imagen se muestran ampliaciones (3x) del SIA analizado. Todas las imágenes se obtuvieron manteniendo constantes las condiciones de exposición en un microscopio confocal (Materiales y Métodos). (B, C) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia integrada de ankirinaG (B) y canal de sodio (C) en neuronas GFP y P2X7-GFP positivas en presencia (barras azules) o ausencia (barras negras) de BBG (100 nM) y representada como la media (U. R.)  $\pm$  error estándar de 3 experimentos independientes (30 neuronas/condición experimental de cada experimento). \*\*\* $p$ <0.001 (test ANOVA).

de intensidad de fluorescencia de las proteínas del SIA ( $0.76 \pm 0.05$  U.R. (AnkG) y  $0.76 \pm 0.08$  U.R. (canal de sodio), mientras que aquellas neuronas que expresan el ARN de interferencia no se vieron afectadas por el tratamiento con ATP, siendo los marcajes de ankirina G y canal de sodio similares a las neuronas control ( $1.14$



**Figura R27. La supresión del receptor P2X7 bloquea la reducción en la concentración de ankirina G y canales de sodio en el SIA de neuronas de hipocampo en cultivo.** (A) Neuronas hipocámpales de 20 DIV nucleofectadas con el vector de interferencia del receptor P2X7 (P2X7 shRNA) y su plásmido control (sc shRNA) y tratadas con o sin ATP (1 mM) las últimas 24h. Estas neuronas fueron teñidas con ankirina G (rojo). Barra de escala= 50  $\mu$ m. A la derecha de cada imagen se muestran ampliaciones (3x) del SIA analizado. (B, C) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia integrada de ankirina G (B) y canal de sodio (C) en neuronas sc shRNA y P2X7 shRNA positivas en presencia (barras blancas) o ausencia (barras negras) de ATP (1 mM) y representada como la media (U. R.)  $\pm$  error estándar de 3 experimentos independientes (30 neuronas/condición experimental de cada experimento). \*\*\* $p$ <0.001 (test ANOVA).

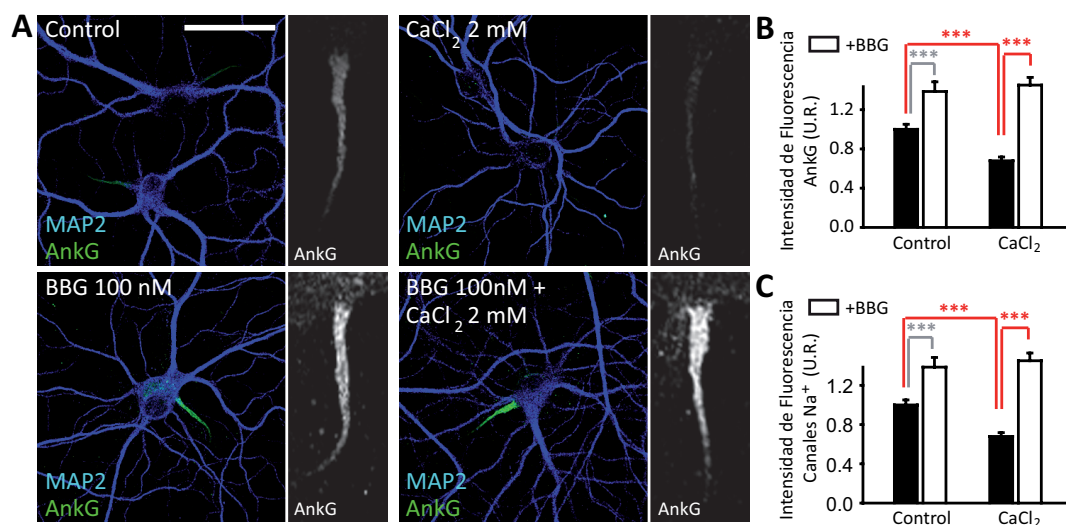
$\pm 0.10$  U.R. y  $1.16 \pm 0.1$  U.R. respectivamente) (**Fig. R27**).

De este grupo de experimentos podemos concluir que la activación del receptor P2X7 está mediando el desensamblaje de los componentes del SIA, ankirina G y canal de  $\text{Na}^+$ , en neuronas de hipocampo en cultivo.

## 6.2. La modulación de la expresión de las proteínas del SIA por el receptor P2X7 es dependiente de calcio.

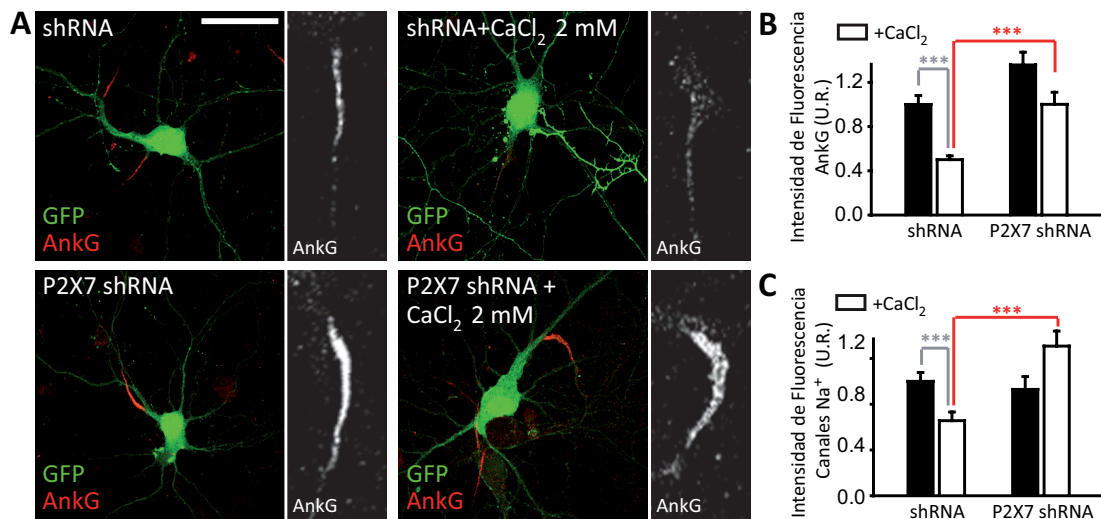
Como hemos descrito anteriormente, la activación del receptor P2X7 permite la entrada sostenida de calcio a la neurona y el incremento de su concentración intracelular (**Fig. O1 y R4**). Por esta razón, nos planteamos la hipótesis de que la modulación de la expresión de las proteínas del SIA que observamos, pudiera ser dependiente de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular a través de dicho receptor. Para comprobarlo, realizamos dos tratamientos diferentes: (1) incrementamos la concentración extracelular, añadiendo al medio de cultivo  $\text{CaCl}_2$  (+ 2 mM) y (2) secuestramos el  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular utilizando EGTA (2 mM) durante 24h.

En primer lugar el tratamiento con  $\text{CaCl}_2$  (+ 2 mM), provoca un descenso de ankirina G y canales de sodio de aproximadamente un 30%, similar al que observamos con ATP (**Fig. R28A**). Esta reducción de la intensidad de fluorescencia es bloqueada por el tratamiento con el antagonista del receptor P2X7 (BBG, 100 nM), tanto en el caso de la ankirina G ( $1.18 \pm 0.06$  U.R. en neuronas tratadas con  $\text{CaCl}_2$ +BBG vs  $0.62 \pm 0.03$  U.R. en neuronas tratadas con  $\text{CaCl}_2$ ) (**Fig. R28 A y B**), como del canal de sodio ( $1.45 \pm 0.08$  U.R. en neuronas tratadas con  $\text{CaCl}_2$  + BBG vs  $0.68 \pm 0.04$  U.R. en neuronas tratadas con  $\text{CaCl}_2$ ) (**Fig. R28C**).



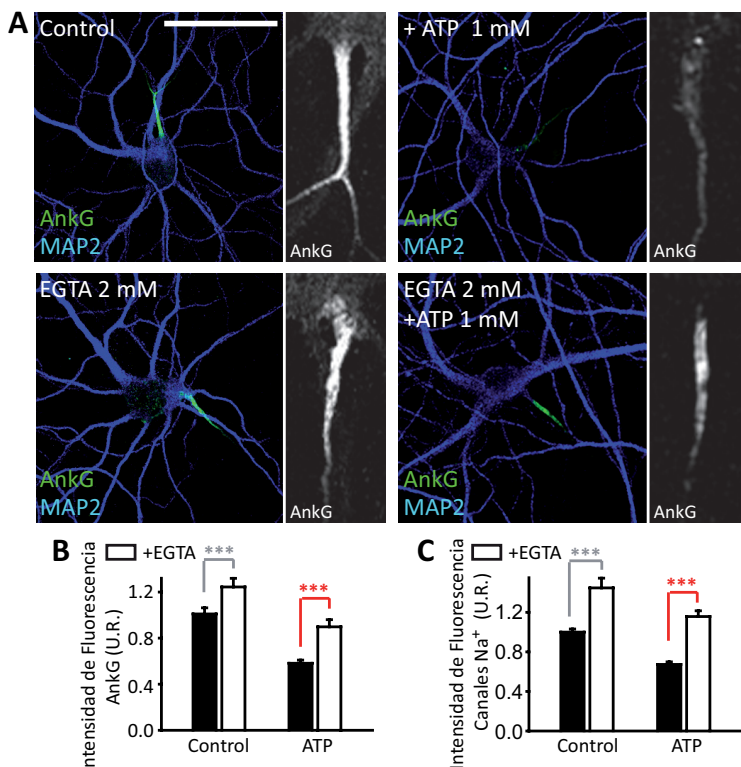
**Figura R28. Los efectos en la regulación del SIA son dependientes de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del receptor P2X7.** (A) Imágenes representativas de neuronas hipocámpales de 20 DIV control y tratadas con  $\text{CaCl}_2$  2mM y BBG (100 nM) de forma independiente o en combinación y teñidas con MAP2 (azul) y ankirinaG (verde). Barra de escala= 50  $\mu\text{m}$ . A la derecha de cada imagen se muestran ampliaciones (3x) del SIA analizado. Todas las imágenes se obtuvieron manteniendo constantes las condiciones de exposición en un microscopio confocal (Materiales y Métodos). (B, C) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia integrada de ankirinaG (B) y canal de sodio (C) en neuronas control y tratadas con  $\text{CaCl}_2$  (2 mM) en presencia (barras azules) o ausencia (barras negras) de BBG (100 nM) y representada como la media (U. R.)  $\pm$  error estándar de 3 experimentos independientes (30 neuronas/condición experimental de cada experimento). \*\*\* $p < 0.001$  (test ANOVA).

Por otro lado, estos experimentos con  $\text{CaCl}_2$  se realizaron en neuronas donde el receptor P2X7 se había suprimido mediante un ARN de interferencia. En las neuronas nucleofectadas con un interferente control



**Figura R29. La supresión del receptor P2X7 bloquea la reducción en la concentración de ankirina G y canales de sodio en el SIA mediada por CaCl<sub>2</sub> en neuronas de hipocampo en cultivo.** (A) Neuronas hipocampales de 20 DIV nucleofectadas con el vector de interferencia del receptor P2X7 (P2X7 shRNA) y su plásmido control (sc shRNA) y tratadas con o sin CaCl<sub>2</sub> (2 mM) las últimas 24h. Estas neuronas fueron teñidas con ankirina G (rojo). Barra de escala= 50 μm. A la derecha de cada imagen se muestran ampliaciones (3x) del SIA analizado. Todas las imágenes se obtuvieron manteniendo constantes las condiciones de exposición en un microscopio confocal (Materiales y Métodos). (B, C) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia integrada de ankirinaG (B) y canal de sodio (C) en neuronas sc shRNA y P2X7 shRNA positivas en presencia (barras azules) o ausencia (barras negras) de CaCl<sub>2</sub> (2 mM) y representada como la media (U. R.) ± error estándar de 3 experimentos independientes (30 neuronas/condición experimental de cada experimento). \*\*\*p<0.001 (test ANOVA).

(scrambled shRNA) el tratamiento con CaCl<sub>2</sub> induce un descenso en la intensidad de fluorescencia de ankirina G y canal de sodio ( $0.50 \pm 0.03$  U.R. y  $0.66 \pm 0.08$  U.R. respectivamente) con respecto a las neuronas no tratadas con CaCl<sub>2</sub> ( $1 \pm 0.08$  U.R.), sin embargo, este descenso no se observa en neuronas que sobre-expresan el vector de interferencia del receptor P2X7 ( $1.00 \pm 0.10$  U.R. (ankirina G) y  $1.31 \pm 0.13$  U.R. (canal de sodio),

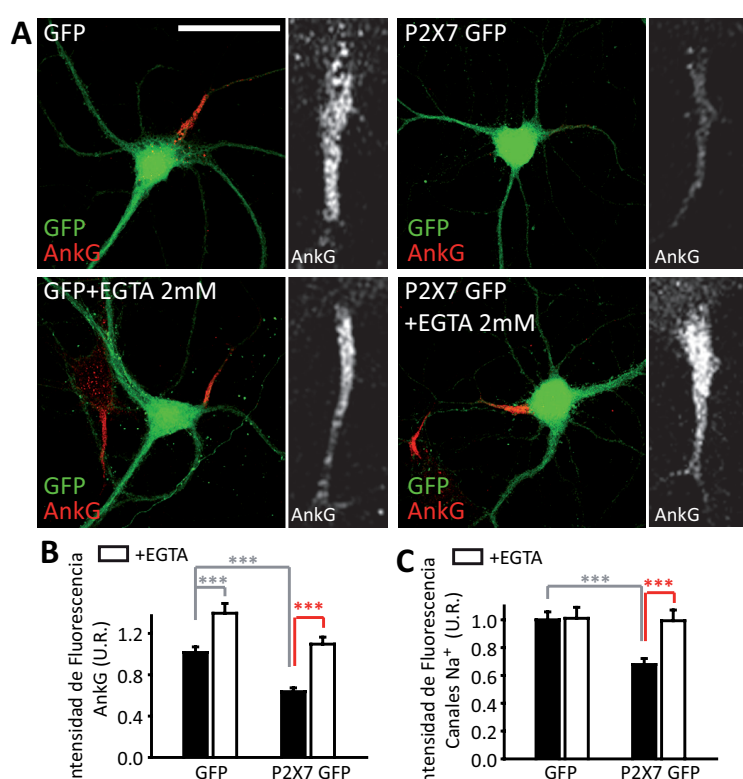


**Figura R30. La reducción de CaCl<sub>2</sub> extracelular con EGTA bloquea la disminución de concentración de ankirina G y canal de sodio mediada por la activación del receptor P2X7.** (A) Imágenes representativas de neuronas hipocampales de 20 DIV control y tratadas con ATP 1 mM y EGTA (2 mM) de forma independiente o en combinación y teñidas con MAP2 (azul) y ankirina G (verde). Barra de escala= 50 μm. A la derecha de cada imagen se muestran ampliaciones (3x) del SIA analizado. Todas las imágenes se obtuvieron manteniendo constantes las condiciones de exposición en un microscopio confocal (Materiales y Métodos). (B, C) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia integrada de ankirina G (B) y canal de sodio (C) en neuronas control y tratadas con ATP (1 mM) en presencia (barras blancas) o ausencia (barras negras) de EGTA (2 mM) y representada como la media (U. R.) ± error estándar de 3 experimentos independientes (30 neuronas/condición experimental de cada experimento). \*\*\*p<0.001 (test ANOVA).



obteniendo valores de intensidad de interferencia similares a los valores control o superiores (**Fig. R29**).

En el siguiente abordaje, añadimos ATP (+ 1 mM) al medio de cultivo neuronal en presencia de EGTA (2 mM) durante 24h en neuronas de hipocampo en cultivo de 20 DIV. En la figura R30A observamos que el secuestro del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular impide la reducción de intensidad de fluorescencia de ankirina G y canal de sodio ( $0.90 \pm 0.06$  U.R. y  $1.16 \pm 0.06$  U.R., respectivamente vs  $1 \pm 0.03$  U.R. en neuronas control) a diferencia del tratamiento con ATP en ausencia de EGTA ( $0.58 \pm 0.03$  U.R. (ankG) (**Fig. R30 A y B**) y  $0.67 \pm 0.03$  U.R. (canal de sodio) (**Fig. R30C**). Paralelamente, en neuronas de hipocampo que sobre-expresan el receptor P2X7-GFP activo, el tratamiento con EGTA (2 mM) impide el descenso de la intensidad de fluorescencia de los marcajes de ankirina G y canales de  $\text{Na}^+$ , presentando valores similares a las neuronas control ( $1.1 \pm 0.07$  U.R. y  $0.99 \pm 0.08$  U.R., respectivamente) (**Fig. R31**).



**Figura R31. El tratamiento con EGTA recupera y aumenta la expresión de ankirina G y canales de sodio en el SIA en neuronas que sobre-expresan el receptor P2X7.** (A) Imágenes representativas de neuronas hipocámpales de 20 DIV nucleofectadas con un plásmido control (GFP) y el vector de expresión de P2X7 (P2X7-GFP). Algunas de ellas fueron tratadas con EGTA (2 mM). Las neuronas se tiñeron con ankirina G (rojo). Barra de escala= 50  $\mu\text{m}$ . A la derecha de cada imagen se muestran ampliaciones (3x) del SIA analizado. Todas las imágenes se obtuvieron manteniendo constantes las condiciones de exposición en un microscopio confocal (Materiales y Métodos). (B, C) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia integrada de ankirina G (B) y canal de sodio (C) en neuronas GFP y P2X7-GFP positivas en presencia (barras blancas) o ausencia (barras negras) de EGTA (2 mM) y representada como la media (U. R.)  $\pm$  error estándar de 3 experimentos independientes (30 neuronas/condición experimental de cada experimento). \*\*\*p<0.001 (test ANOVA).

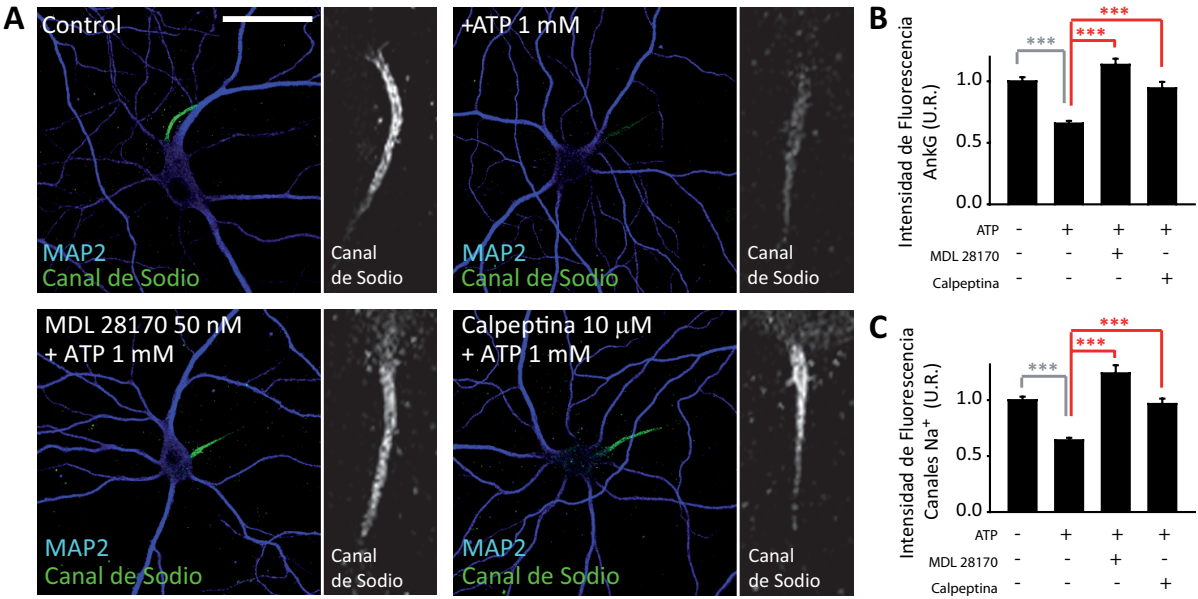
Es decir, este grupo de experimentos indican que la disminución de intensidad de fluorescencia de ankirina G y canal de sodio es debida a la entrada de calcio a través del receptor P2X7.

### 6.3. La degradación de ankirina G y canales de $\text{Na}^+$ en el SIA está mediada por calpaína.

Una vez confirmado el papel del calcio y el receptor P2X7 en la regulación del segmento inicial del axón, y teniendo en cuenta que la inhibición de la proteasa activada por calcio, calpaína, previene el daño en el SIA (Schafer et al., 2009), analizamos la posibilidad de que dicha proteasa pudiera estar degradando las proteínas del SIA tras la activación del receptor P2X7. Para ello, utilizamos dos inhibidores diferentes y específicos de calpaína: calpeptina y MDL 28170 para bloquear la actividad de dicha enzima.

En primer lugar, neuronas de 20 DIV fueron tratadas con 1 mM ATP en presencia o ausencia de calpeptina (10  $\mu$ M) o MDL 28170 (50 nM) durante 24h. En la figura 32 observamos, como hemos descrito anteriormente, que el tratamiento con ATP reduce el marcaje de ankirina G y canal de sodio en el SIA ( $0.66 \pm 0.02$  U.R. y  $0.64 \pm 0.02$  U.R., respectivamente), sin embargo, el tratamiento con ambos inhibidores de calpaína impide este efecto recuperando los valores de intensidad de fluorescencia similares al control tanto para ankirina G ( $1.13 \pm 0.05$  U.R. (MDL) y  $0.94 \pm 0.05$  U.R. (calpeptina) (**Fig. R32B**), como para canales de sodio ( $1.24 \pm 0.07$  U.R. (MDL) y  $0.97 \pm 0.05$  U.R. (calpeptina) vs  $1 \pm 0.03$  U.R en neuronas control (ambos marcajes) (**Fig. R32 A y C**). De igual forma en la figura 33 observamos que en neuronas de 20 DIV que sobre-expresan el receptor P2X7 activo, el tratamiento con ambos inhibidores de calpaína induce una recuperación de la intensidad de fluorescencia similar o superior a los controles en el marcaje de ankirina G ( $1.30 \pm 0.07$  U.R. (MDL) y  $1.08 \pm 0.06$  U.R. (calpeptina)) y canales de sodio ( $0.98 \pm 0.05$  U.R. (MDL) y  $1 \pm 0.08$  U.R. (calpeptina)) , impidiendo el descenso de expresión de ankirina G (**Fig. R33B**) y canal de Na<sup>+</sup> (**Fig. R33 A y C**) descrito con la sobre-expresión del receptor P2X7 ( $0.64 \pm 0.03$  U.R. y  $0.068 \pm 0.03$  U.R., respectivamente).

En conclusión, la modulación de las proteínas integrantes del SIA está mediada por la activación del receptor P2X7, que permite la entrada de calcio y la activación de la proteasa calpaína, que degrada ankirina G y canales de sodio.



**Figura R32. El receptor P2X7 induce la degradación de proteínas del SIA de una forma calpaína-dependiente.** (A) Imágenes representativas de neuronas hipocámpales de 20 DIV control y tratadas con ATP 1mM en presencia o ausencia de dos inhibidores diferentes de calpaína (calpeptina, 10  $\mu$ M) y MDL-28170 (50 nM) y teñidas con MAP2 (azul) y canal de sodio (verde). Barra de escala= 50  $\mu$ m. A la derecha de cada imagen se muestran ampliaciones (3x) del SIA analizado. Todas las imágenes se obtuvieron manteniendo constantes las condiciones de exposición en un microscopio confocal (Materiales y Métodos). (B, C) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia integrada de ankirina G (B) y canal de sodio (C) en neuronas control y tratadas con ATP (1mM) sólo o en combinación con calpeptina (10  $\mu$ M) o MDL-28170 (50 nM) y representada como la media (U. R.)  $\pm$  error estándar de 3 experimentos independientes (30 neuronas/condición experimental de cada experimento). \*\*\*p<0.001 (test ANOVA).

#### 6.4. El receptor P2X7 modula la corriente de sodio dependiente de voltaje y la excitabilidad neuronal en neuronas hipocámpales.

Todos los datos descritos hasta el momento sugieren que la modulación de la actividad del receptor P2X7 es importante para la regulación de los canales iónicos dependientes de voltaje en el SIA, que como hemos

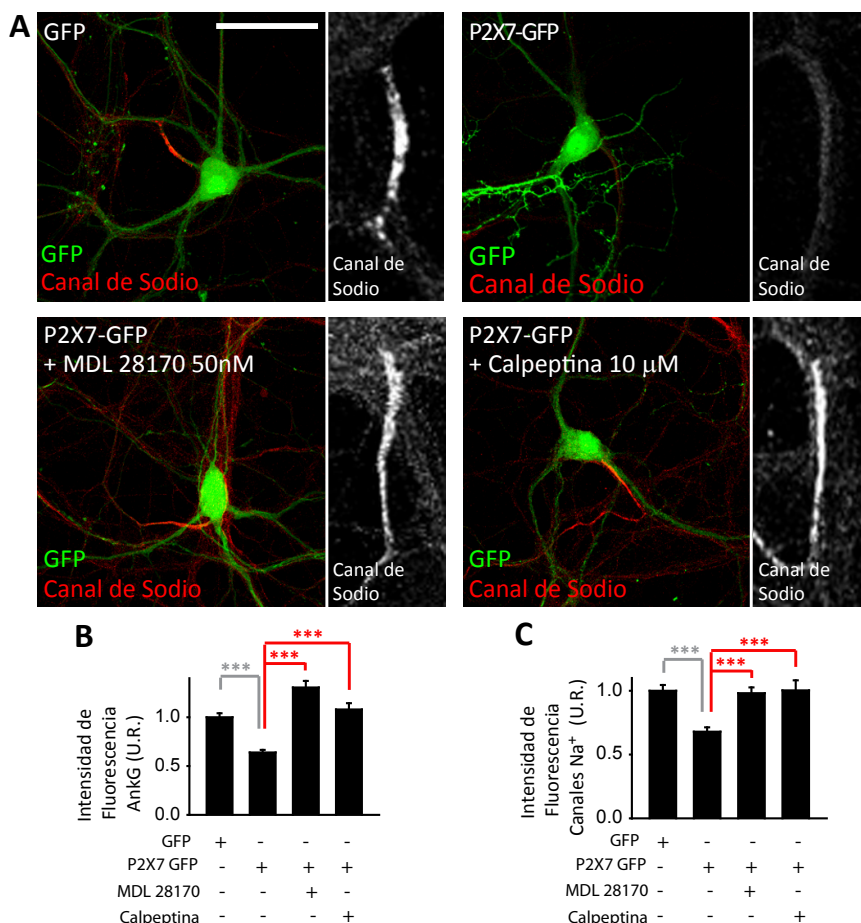


Figura R33. El tratamiento con inhibidores de calpaína recupera y aumenta la expresión de ankirina G y canales de sodio en el SIA en neuronas que sobre-expresan el receptor P2X7. (A) Imágenes representativas de neuronas hipocámpales de 20 DIV nucleofectadas con un plásmido control (GFP) y el vector de expresión de P2X7 (P2X7-GFP). Algunas de ellas fueron tratadas con calpeptina (10  $\mu$ M) o MDL-28170 (50 nM). Las neuronas se tiñeron con canal de sodio (rojo). Barra de escala= 50  $\mu$ m. A la derecha de cada imagen se muestran ampliaciones (3x) del SIA analizado. Todas las imágenes se obtuvieron manteniendo constantes las condiciones de exposición en un microscopio confocal (Materiales y Métodos). (B, C) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia integrada de ankirina G (B) y canal de sodio (C) en neuronas GFP y P2X7-GFP positivas, algunas de ellas tratadas con calpeptina (10  $\mu$ M) o MDL-28170 (50 nM) y representada como la media (U. R.)  $\pm$  error estándar de 3 experimentos independientes (30 neuronas/condición experimental de cada experimento). \*\*\* $p$ <0.001 (test ANOVA).

dicho anteriormente es el lugar de inicio de los potenciales de acción, relacionando dicho receptor con la modulación de la excitabilidad neuronal. Para analizar la influencia del receptor P2X7 en la modulación de la excitabilidad neuronal, utilizamos rodajas de cerebro de ratas P7 cultivadas *in vitro* durante 24 horas antes de tratarlas con BBG (200 nM) durante 48 horas. En estas rodajas se registraron y analizaron las corrientes

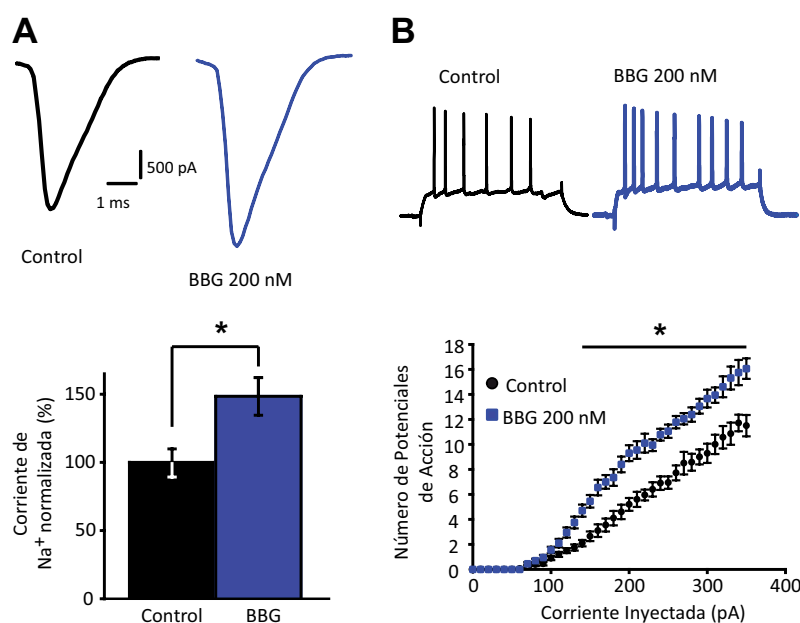
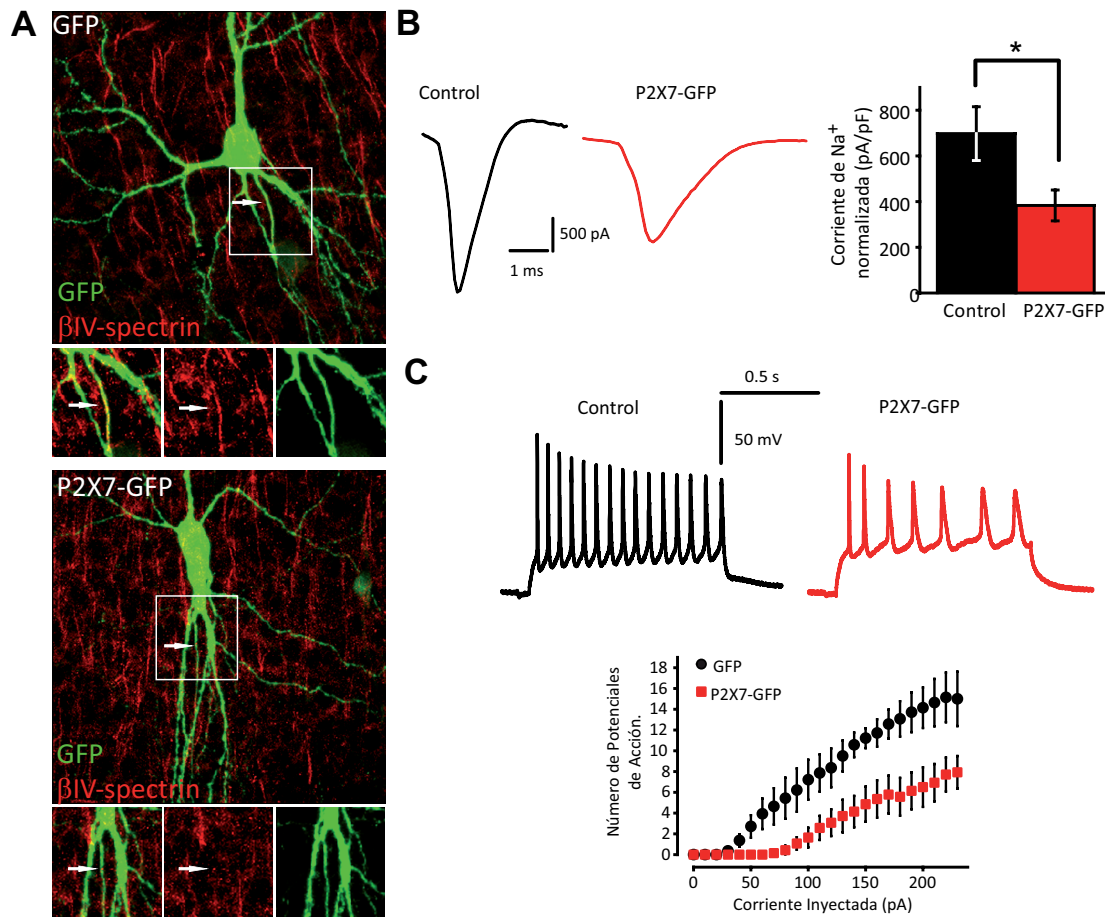


Figura R34. La inhibición del receptor P2X7 con BBG aumenta la amplitud de la corriente de sodio y la excitabilidad neuronal en rodajas de cerebro en cultivo. (A) Corrientes de sodio registradas en neuronas de la región CA3 de hipocampo de rodajas de cerebro de ratón control (negro) o tratadas con BBG (200 nM) (azul) durante 48h. Las corrientes fueron evocadas por un pulso de despolarización de -70 mV a 0 mV. Cuantificación de la densidad de corriente de sodio en neuronas control (negro) y tratadas con BBG (200 nM) (azul) y representada como la media  $\pm$  error estándar de un número de 10 neuronas de cada condición experimental. \* $p$ <0.05 (t-test). (B) Perfil de disparo más representativo de neuronas control y neuronas tratadas con BBG (200 nM). Curvas *input-output* que representan el número de picos de potencial de acción frente a la intensidad de corriente aplicada para neuronas control y tratadas con BBG. \* $p$ <0.05 (t-test). El número de neuronas registradas fue 10 en cada condición experimental.

de sodio en neuronas de hipocampo de la región CA3 utilizando la técnica de *voltage clamp*. Las neuronas registradas en rodajas tratadas con BBG presentan un aumento de la corriente de sodio de alrededor del 45% (**Fig. R34A**). A continuación, en las mismas neuronas analizamos la excitabilidad neuronal utilizando la técnica de *current clamp*. En la figura R34B observamos que el tratamiento con BBG produce un incremento en el número de potenciales de acción sin afectar al umbral para generar potenciales de acción.

A continuación, para comprobar el efecto de la activación de P2X7 en la excitabilidad neuronal utilizamos la técnica de *GeneGun* para transfectar neuronas utilizando el plásmido que expresa P2X7-GFP o GFP. Las rodajas se dejaron en cultivo durante 48 horas antes de disparar sobre las rodajas, tras lo cual se mantuvieron en cultivo de 24 a 48 horas para expresar la proteína antes de registrar electrofisiológicamente las neuronas. En este caso, se registraron neuronas piramidales de corteza, dado que la probabilidad de encontrar neuronas de hipocampo positivas para GFP en las rodajas era muy baja y variable entre regiones del hipocampo. De nuevo, se utilizó la técnica de *patch-clamp* (voltaje-clamp o current-clamp) para estudiar la excitabilidad



**Figura R35. La expresión exógena del receptor P2X7 reduce la amplitud de la corriente de sodio y la excitabilidad neuronal en rodajas de cerebro en cultivo.** (A) Secciones de cerebro mantenidas en cultivo durante 48h y transfectadas con la tecnología del *GeneGun* con el plásmido de expresión de P2X7 (P2X7-GFP) y su plásmido control (GFP). Pasadas 48h se fijaron y se tiñeron con un anticuerpo contra βIV-espectrina (rojo). Las imágenes inferiores muestran una visión ampliada del segmento inicial donde las flechas señalan la posición del SIA. (B) Corrientes de sodio registradas en neuronas piramidales de corteza de rodajas de cerebro de ratón que expresan GFP (negro) o P2X7-GFP (rojo). Las corrientes fueron evocadas por un pulso de despolarización de -70 mV a 0 mV. Cuantificación de la densidad de corriente de sodio en neuronas GFP positivas (negro) o P2X7-GFP positivas (rojo) y representada como la media ± error estándar de un número de 8 neuronas de cada condición experimental. \*p<0.05 (t-test). (C) Perfil de disparo más representativo de neuronas GFP positivas (negro) o P2X7-GFP positivas (rojo). Curvas *input-output* que representan el número de picos de potencial de acción frente a la intensidad de corriente aplicada para neuronas control y tratadas con BBG. \*p<0.05 (t-test). El número de neuronas registradas fue 8 en cada condición experimental.

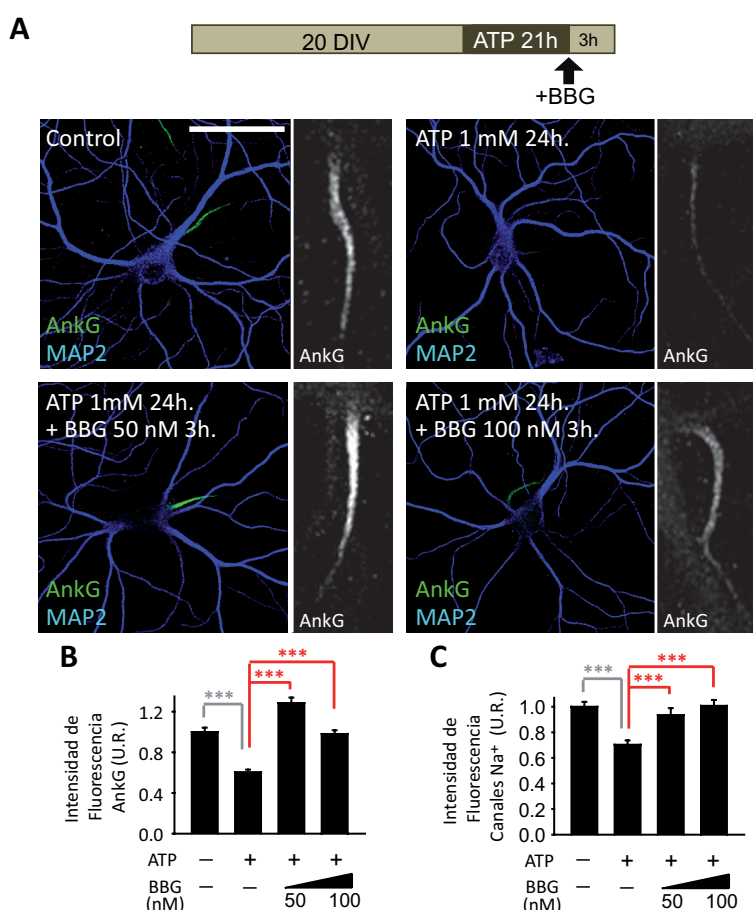


neuronal. Las neuronas que expresaban P2X7-GFP presentaban una reducción de la amplitud de corriente de sodio de  $383.17 \pm 67.5$  pA/pF, un 50 % menor que la que se observó en neuronas que expresaban GFP o neuronas control ( $697.56 \pm 117.77$  pA/pF) (**Fig. R35B**). Esas mismas neuronas P2X7-GFP positivas generaron un número significativamente menor de potenciales de acción y un mayor umbral de disparo (**Fig. R35C**). De esta forma, confirmamos que la inhibición del receptor P2X7 aumenta la excitabilidad neuronal, mientras que su activación la disminuye.

Por último, fijamos algunas de las rodajas y comprobamos la expresión de otra proteína estructural del segmento inicial del axón,  $\beta$ IV-espectrina. Esta proteína es necesaria para el anclaje de ankirina G y canales de sodio en el segmento inicial del axón. En la figura R35A observamos que mientras que las neuronas control o transfectadas con GFP presentaban un marcaje de  $\beta$ IV-espectrina asociado al SIA, aquellas neuronas transfectadas con el plásmido P2X7-GFP carecen de marcaje  $\beta$ IV-espectrina en el SIA, confirmando los resultados obtenidos mediante las técnicas de electrofisiología y los previamente obtenidos en las neuronas de hipocampo en cultivo.

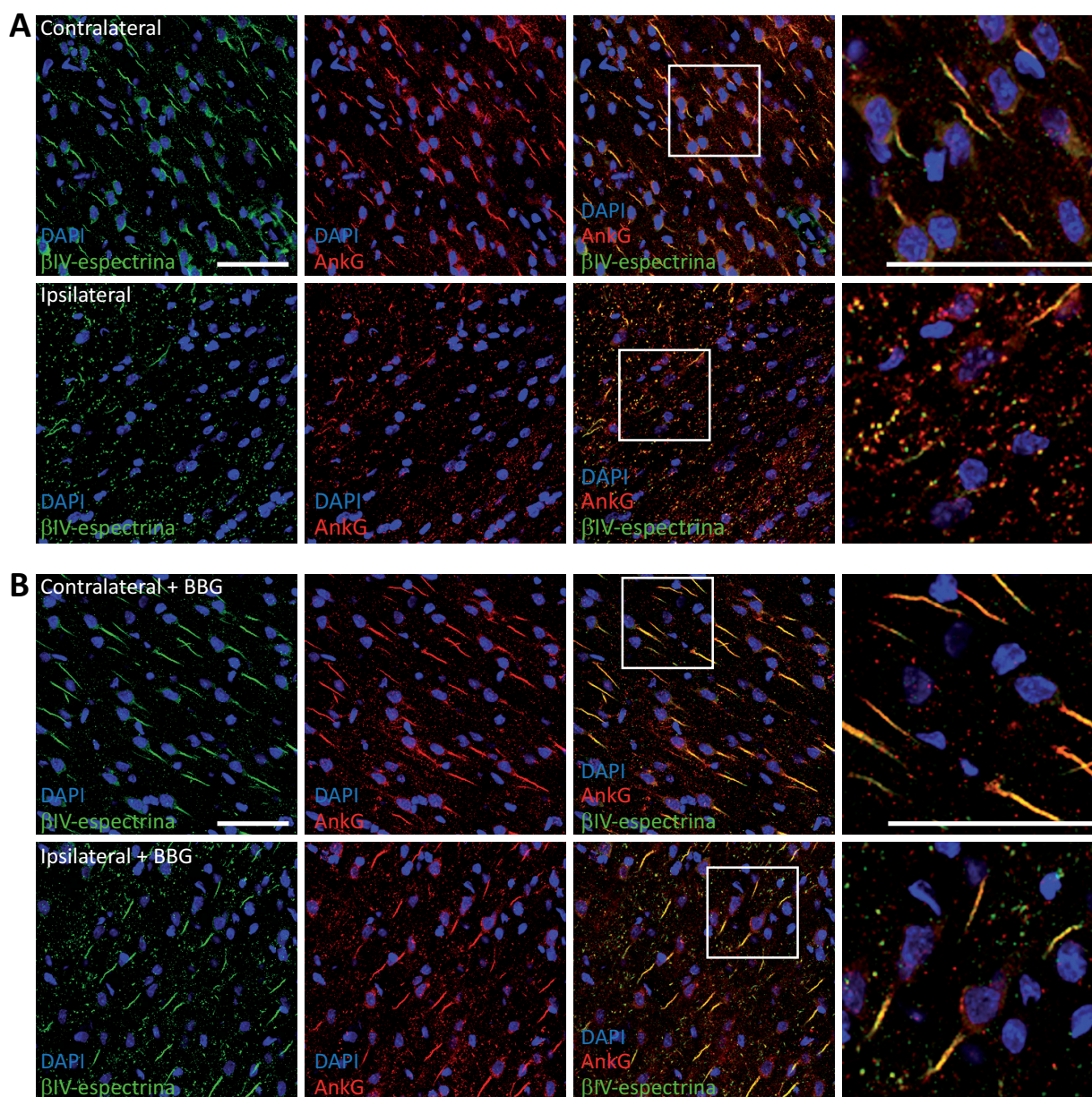
### 6.5. El antagonista del receptor P2X7, BBG, reduce el daño en el SIA tras un proceso de ischemia cerebral.

Una vez analizado el papel del receptor P2X7 en el proceso de degradación de las proteínas del SIA y en la modulación de la excitabilidad neuronal, quisimos estudiar su posible implicación en condiciones patológicas. Como hemos descrito hasta el momento, el  $\text{Ca}^{+2}$  es un regulador importante de la función del SIA y también está implicado en la degradación de las proteínas del SIA tras procesos de ischemia; sin embargo, antagonistas de los receptores de NMDA no consiguen recuperar la pérdida de segmentos iniciales tras el proceso de



**Figura R36. La inhibición del receptor P2X7 durante 3h tras un tratamiento con ankirinaG y ATP recupera la concentración de ankirinaG y canal de sodio en el SIA. (A)** Imágenes representativas de neuronas hipocampales de 20 DIV control y tratadas con ATP 1mM durante 21h en cultivo a las que posteriormente se les añadió BBG (50 y 100 nM) durante 3h. Estas neuronas se tiñeron con MAP2 (azul) y ankirinaG para cuantificar la intensidad de fluorescencia del SIA. Barra de escala= 50  $\mu$ m. A la derecha de cada imagen se muestran ampliaciones (3x) del SIA analizado. Todas las imágenes se obtuvieron manteniendo constantes las condiciones de exposición en un microscopio confocal (Materiales y Métodos). **(B, C)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia integrada de ankirinaG **(B)** y canal de sodio **(C)** en neuronas control y tratadas con ATP (1mM) 24h sólo o tras añadir BBG (50 y 100 nM) durante 3h y representada como la media (U. R.)  $\pm$  error estándar de 3 experimentos independientes (30 neuronas/condición experimental de cada experimento). \*\*\* $p < 0.001$  (test ANOVA).

isquemia (Schafer et al., 2009). Por otro lado, el receptor P2X7 presenta una alta permeabilidad al  $\text{Ca}^{+2}$ , similar a la de los receptores NMDA (Abbracchio et al., 2009), aumenta su expresión en neuronas tras el proceso de isquemia (Franke et al., 2004) y su inhibición con BBG reduce la muerte neuronal tras este proceso (Arbeloa et al., 2012). Además, durante el proceso de isquemia tiene lugar una liberación masiva de ATP al medio extracelular que genera excitotoxicidad a través de los receptores P2X7 (Melani et al., 2006; Melani et al., 2005). Todas estas características hacen que el receptor P2X7 pueda jugar un papel importante durante el proceso de isquemia.



**Figura R37. La inhibición del receptor P2X7 recupera parcialmente la concentración de ankirina G y βIV-espectrina en el SIA de ratas sometidas a un proceso de isquemia cerebral.** Ratas Wistar fueron sometidas a un proceso de isquemia cerebral transitoria mediante una oclusión de la arteria cerebral medial (tMCAO). Tras la cirugía fueron tratadas según se describe en Materiales y Métodos con BBG (B) o un vehículo control (A) y tras tres días de tratamiento fueron sacrificadas. Sus cerebros se cortaron en secciones coronales que fueron teñidas con ankirina G (rojo), βIV-espectrina (verde) y DAPI para marcar los núcleos de neuronas corticales. Se muestran imágenes representativas del hemisferio dañado (ipsilateral) y el no dañado (contralateral). La columna de la derecha muestra una ampliación de la zona marcada en las imágenes adyacentes. Barras de escala= 50 μm. Se analizaron 2 ratas por cada condición experimental.

Como un primer abordaje *in vitro*, tratamos neuronas hipocampales en cultivo durante 21h con ATP 1mM para generar la degradación de proteínas del SIA que hemos descrito previamente, y durante las últimas 3h de tratamiento añadimos BBG (50 y 100 nM) para analizar una posible recuperación del daño generado en el SIA. En la figura R36 observamos que el tratamiento con BBG durante 3h tras el tratamiento con ATP produce una recuperación de intensidad de fluorescencia tanto en el marcaje de ankirina G ( $1.29 \pm 0.05$  U.R. (50nM) y  $0.98 \pm 0.04$  U.R. (100nM)) (**Fig. R36 A y B**) como de canales de sodio ( $0.94 \pm 0.05$  U.R. (50nM) y  $1 \pm 0.05$  U.R. (100nM)) (**Fig. R36C**) similar o superior a las neuronas control ( $1 \pm 0.04$  U.R.), a diferencia de las neuronas tratadas únicamente con ATP durante 24h en cultivo ( $0.61 \pm 0.03$  U.R. (ankG) y  $0.70 \pm 0.04$  U.R.(canal de sodio)). Es decir, una vez generado el daño en el SIA, el tratamiento con BBG durante 3h es capaz de recuperar los niveles de expresión de las proteínas del SIA en neuronas hipocampales.

Finalmente, utilizamos un modelo de isquemia transitoria generado por oclusión de la arteria cerebral medial (tMCAO) en ratas durante 90 minutos. Las ratas fueron tratadas mediante inyecciones intraperitoneales con BBG tras 3 y 6 horas después de la reperusión y después dos veces al día hasta las 72h. Las ratas fueron sometidas a test neurológicos para comprobar la que se había generado de forma correcta la isquemia tras la cirugía y antes de cada inyección (Yrjanheikki et al., 2005). La puntuación en este test en las ratas control fue 5, mientras que las ratas sometidas a isquemia obtuvieron una puntuación de 3 que se recuperó a 4 sólo en las ratas tratadas con BBG. En la figura R37 observamos que tras el proceso de isquemia, existe una desorganización e incluso desaparición de segmentos iniciales en neuronas corticales de la zona de daño, marcados inmunohistoquímicamente con ankirina G y  $\beta$ IV-espectrina (**Fig. R37A**), mientras que las ratas tratadas con BBG durante 72h presentan una recuperación parcial del marcaje de ankirina G en segmentos iniciales (**Fig. R37B**).

En conclusión, el tratamiento con BBG promueve una recuperación del marcaje de segmentos iniciales en la zona de daño de cerebros sometidos a un proceso de isquemia, y por tanto, una posible recuperación en la funcionalidad de las neuronas de la zona dañada. Como se discutirá a continuación, estos resultados ponen de relevancia la importancia del sistema purinérgico en procesos fisiológicos y patológicos, y se proponen como dianas terapéuticas en el tratamiento de enfermedades asociadas a cambios en la excitabilidad neuronal.





## ***Discusión***

---



En esta tesis hemos estudiado la función de los receptores purinérgicos activados por ADP y ATP dentro del marco de la elongación axonal y el mantenimiento del SIA, con el objetivo de mejorar la comprensión de los mecanismos que gobiernan el proceso de desarrollo neuronal en condiciones fisiológicas y patofisiológicas. Para abordar dicho objetivo, hemos estudiado en profundidad la influencia de los receptores P2Y1, P2Y13 y P2X7 durante el proceso de elongación axonal en las primeras etapas de desarrollo neuronal, así como los mecanismos de señalización implicados en este proceso. Asimismo, centrándonos en etapas posteriores de desarrollo, hemos estudiado la influencia del ATP extracelular y el receptor P2X7 en el mantenimiento de la estructura y funcionalidad del SIA, tanto en condiciones fisiológicas, utilizando nuestro modelo de hipocampo en cultivo, como patofisiológicas, tras la generación de daño neuronal utilizando un modelo isquemia.

## **1. LOS NUCLEÓTIDOS DE ADENINA, UNA SEÑAL EXTRACELULAR QUE REGULA EL PROCESO DE ELONGACIÓN AXONAL.**

En el sistema nervioso, los nucleótidos de adenina, ATP y ADP, tienen un papel importante en las redes de señalización neurona-glía, y regulan tanto procesos fisiológicos de gran relevancia, tales como la transmisión sináptica, así como múltiples efectos tróficos incluyendo la regulación del crecimiento y desarrollo neuronal. También están implicados en procesos patofisiológicos relacionados con enfermedades asociadas al daño cerebral en el sistema nervioso central, desórdenes neuropsiquiátricos y enfermedades neurodegenerativas (Burnstock et al., 2011b).

Está ampliamente demostrado que el ATP puede ser almacenado y liberado al medio extracelular por neuronas y células gliales, como los astrocitos, permitiendo la interacción entre ambos tipos celulares en condiciones fisiológicas y patofisiológicas (Bowser and Khakh, 2007; Coco et al., 2003; Pankratov et al., 2006; Thompson et al., 2006). Una vez en el medio extracelular, el ATP puede ser degradado por ectonucleotidasas extracelulares, que no solo controlan su vida media, sino que también producen nuevos nucleótidos, como ADP o adenosina, que a su vez funcionan como agonistas para otros receptores purinérgicos (Zimmermann, 2000). La gran familia de receptores purinérgicos está ampliamente expresada en el sistema nervioso, desde las etapas iniciales de desarrollo del sistema nervioso central, donde regulan procesos importantes como la proliferación de la glía radial y posterior migración de precursores neuronales, procesos de diferenciación a los diferentes tipos de neuronas y la formación de redes neuronales (Burnstock and Ulrich, 2011). Sin embargo, al inicio de este trabajo no se sabía nada acerca de su posible función durante el desarrollo neuronal y el crecimiento axonal, procesos imprescindibles para que tenga lugar la formación de contactos sinápticos y, en último término la formación de redes neuronales.

### **1.1. El ATP y el receptor P2X7 como reguladores negativos del crecimiento axonal.**

En primer lugar, estudiamos los efectos del ATP extracelular en la elongación axonal en nuestro modelo de cultivo de neuronas de hipocampo. Nuestros resultados demuestran que el incremento de la concentración de ATP (+ 1 mM) en el medio extracelular da lugar a neuronas con axones más cortos (**Fig. R1**) y por tanto, actúa como un regulador negativo del proceso de elongación axonal. Este efecto regulador negativo del ATP ha sido demostrado previamente en neuritogénesis en explantes de tubo neural (Cheung et al., 2005) y en neuronas del ganglio espiral, mediado por la activación de los receptores P2X2 y P2X3 (Greenwood et al., 2007). Está ampliamente descrito que el ATP extracelular activa las siete subunidades que conforman la familia de receptores P2X (Burnstock, 2007b), sin embargo, entre todos los inhibidores utilizados en este estudio,

únicamente la inhibición del receptor P2X7 produjo cambios significativos de longitud axonal, obteniendo axones con un importante incremento de longitud y ramificación (**Fig. R2**), incluso en presencia de una elevada concentración de ATP (+ 1 mM) (**Fig. R4**). De hecho, diferentes estudios han mostrado que el receptor P2X7 se activa con concentraciones de ATP extracelular superiores a 100  $\mu$ M, mientras que otros receptores P2X lo hacen a menores concentraciones (Gever et al., 2006; North, 2002). Esta conclusión está además sustentada por los resultados obtenidos tras la expresión o supresión del receptor P2X7, que dan lugar a axones muy cortos o muy largos y ramificados, respectivamente (**Fig. R3**). Por tanto, el ATP juega un importante papel como regulador negativo durante la elongación axonal través del receptor P2X7, contribuyendo de esta forma a la migración del cono axónico en función de gradientes de concentración de ATP. Estos gradientes se pueden encontrar durante el desarrollo tras procesos de apoptosis programada de células, y además pueden actuar como una barrera al crecimiento axonal tras lesiones del sistema nervioso. En este sentido, un estudio ha mostrado que la inhibición del receptor P2X7 contribuye a mejorar los síntomas observados tras lesiones de medula espinal en ratas, reduciendo la inflamación y la muerte neuronal (Wang et al., 2004). En base a nuestros resultados, cabría hipotetizar la posibilidad de utilizar antagonistas del receptor P2X7 como agentes terapéuticos en regeneración axonal.

Al comienzo de este estudio, algunos grupos de investigación ponían en entredicho la expresión del receptor P2X7 en neuronas de hipocampo, defendiendo su expresión en cerebro, pero únicamente en células no neuronales (Collo et al., 1997). Ante esta controversia, nuestros resultados muestran que el receptor P2X7 se localiza en el soma y en el axón de neuronas hipocámpales formando un gradiente creciente hacia el cono de crecimiento axonal (**Fig. R5**). Simultáneamente a este trabajo, un estudio mostró la expresión de ARN mensajero del receptor P2X7 en neuronas de hipocampo (Yu et al., 2008). Asimismo, el tratamiento con ATP en neuronas hipocámpales promueve un incremento de  $\text{Ca}^{+2}$  en la zona correspondiente a la expresión del receptor P2X7, que es bloqueado con su antagonista, BBG (**Fig. R4**) confirmando la funcionalidad del receptor en el cono de crecimiento axonal de neuronas hipocámpales. Además, estos datos se ven apoyados por otros estudios en los que se describe la localización del receptor P2X7 en terminales presinápticos del sistema nervioso central (Deuchars et al., 2001), principalmente en neuronas hipocámpales (Anderson and Nedergaard, 2006; Armstrong et al., 2002; Kukley et al., 2004) y en neuronas granulares de cerebelo (Miras-Portugal et al., 2003).

Se ha descrito que el receptor P2X7 promueve un incremento sostenido de calcio intracelular cuando es activado por ATP (Jiang et al., 2000), además, en nuestro modelo de cultivo este incremento de  $\text{Ca}^{+2}$  se produce de forma localizada en el cono de crecimiento axonal (**Figs. O1 y R4**), pero ¿existe alguna relación entre la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  en el axón y la reducción de longitud axonal observada con el tratamiento con ATP? En esta línea argumental, se ha relacionado la reducción intracelular de  $\text{Ca}^{+2}$  en el cono de crecimiento axonal con un incremento de longitud axonal en neuronas de la medula espinal (Gomez and Spitzer, 1999) y en axones de neuronas corticales en desarrollo (Tang et al., 2003). Sin embargo, otro estudio describe que las corrientes de calcio localizadas en el cono de crecimiento son necesarias para que haya un crecimiento competitivo entre el axón y sus ramificaciones (Hutchins and Kalil, 2008). Asimismo, el cono de crecimiento axonal es una zona muy activa en cuanto se refiere a la dinámica del citoesqueleto de microtúbulos y actina, cuyas modificaciones resultan determinantes durante el proceso de elongación axonal. Por ello, no podemos descartar la posibilidad de que el receptor P2X7 y el  $\text{Ca}^{+2}$  estén modificando la dinámica del citoesqueleto influyendo en el crecimiento axonal. Estudios anteriores apoyan esta idea, puesto que ha sido descrito que el incremento de la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  puede despolimerizar los microtúbulos (Keith et al., 1983), mientras

que, la activación de receptores P2X mediada por ATP induce la formación de filamentos de actina saturados de cofilina y la retracción de neuritas en células PC12 (Homma et al., 2008). Finalmente, el receptor P2X7 forma parte de un complejo en el que están presentes proteínas asociadas al citoesqueleto de actina, como  $\alpha$ -actinina (Kim et al., 2001). Para concluir, experimentos de nuestro laboratorio muestran que las neuronas tratadas con ATP presentan un predominio de lamelipodio en el cono de crecimiento axonal, mientras que la inhibición del receptor P2X7 promueve el desarrollo de filopodios posiblemente relacionados con una velocidad de crecimiento axonal mayor (Díaz-Hernández\*, del Puerto\* et al., 2008). Es decir, que nuestros experimentos, junto con los datos bibliográficos sugieren que el receptor P2X7, mediante la entrada de calcio, puede estar mediando la polimerización del citoesqueleto de actina y la despolimerización de microtúbulos en el cono de crecimiento axonal impidiendo la elongación axonal, aunque serían necesarios experimentos adicionales para confirmarlo.

## 1.2. Función del ADP como modulador positivo del crecimiento axonal mediado por receptores P2Y.

Está firmemente establecido que el ADP funciona como agonista principal de 3 receptores purinérgicos metabotrópicos: P2Y1, P2Y12 y P2Y13 (Burnstock, 2007a; Burnstock et al., 2011a), de los cuales sólo dos, los receptores P2Y1 y P2Y13, se expresan en neuronas de corteza o hipocampo (Csölle et al., 2008). Sin embargo, el receptor P2Y12 no está presente en neuronas hipocámpales y neocorticales (Hollopeter et al., 2001), pero sí se expresa en neuronas de ganglios de la raíz dorsal (Heinrich et al., 2008), tronco cerebral, y en oligodendrocitos (Amadio et al., 2006). En este estudio confirmamos la expresión de los receptores P2Y1 y P2Y13 en nuestro modelo de cultivo y observamos que se localizan, al igual que el receptor P2X7, en el dominio somatodendrítico y en el axón formando un gradiente creciente hacia el cono de crecimiento axonal (Fig. R6).

Nuestros datos reflejan que un incremento de ADP en el medio extracelular promueve un aumento de crecimiento axonal en neuronas hipocámpales, a diferencia de lo que ocurre con el ATP (Fig. R1). Además, esta inducción del crecimiento axonal es consecuencia de la activación del receptor P2Y1, cuya actividad es necesaria para que tenga lugar una correcta elongación axonal en condiciones fisiológicas (Fig. R7 y R8). Tanto el ADP como el receptor P2Y1, han sido relacionados previamente con procesos asociados al desarrollo del cerebro, tales como la proliferación de neuroesferas adultas (Mishra et al., 2006) y la migración de los progenitores neuronales intermedios a la zona subventricular neocortical (Liu et al., 2008).

También analizamos la contribución relativa del ADP a través del receptor P2Y13 durante el proceso de elongación axonal. En este caso observamos que el receptor P2Y13, regula negativamente el crecimiento axonal, puesto que su expresión exógena da lugar a axones más cortos mientras que su inhibición o supresión genera axones más largos (Fig. R7 y R8). En este sentido, un estudio posterior a la publicación de estos resultados confirma la implicación del receptor P2Y13 en la supresión de la diferenciación neuronal, en un modelo de células PC12, y una aceleración del crecimiento de neuritas en presencia de su antagonista, MRS-2211 (Yano et al., 2012). Por otro lado, también se ha descrito que el ADP, a través del receptor P2Y13, puede tener efectos neuroprotectores en neuronas ganglionares de cerebelo durante procesos de estrés mediado por glutamato (Ortega et al., 2011) y el estrés oxidativo (Espada et al., 2010).

A la luz de estos datos, podemos concluir que el ADP activa los receptores P2Y1 y P2Y13 generando efectos

antagónicos durante la elongación axonal. En esta misma línea, el efecto antagónico de los receptores P2Y1 y P2Y13 ha sido descrito previamente en diferentes procesos, tales como el control del dolor (Malin and Molliver, 2010) o la secreción de insulina (Amisten et al., 2010) apoyando nuestros resultados.

### 1.3. Relación entre ATP y ADP y los receptores P2Y1, P2Y13 y P2X7 durante el proceso de elongación axonal.

Los receptores P2Y1 y P2Y13, a pesar de tener un agonista común, presentan efectos antagónicos durante el desarrollo axonal: la activación de ambos receptores con ADP en neuronas hipocámpales supone un incremento de longitud axonal, por tanto entendemos que los efectos de activación del receptor P2Y1 predominan sobre los del P2Y13. Nuestros resultados confirman esta hipótesis, puesto que la inhibición de crecimiento axonal generada por la inhibición o silenciamiento génico del receptor P2Y1 se mantiene incluso cuando inhibimos o suprimimos la expresión del receptor P2Y13 (**Fig. R9**). ¿A qué puede ser debida esta relación de dominancia entre ambos receptores? Una posible explicación subyace en las diferencias en los niveles de expresión de estos receptores en neuronas hipocámpales. El receptor P2Y1 se expresa en mayor medida en neuronas de hipocampo, comparado con la expresión del receptor P2Y13, como observamos en nuestro ensayo de Western-blot (**Fig. R12**) y en experimentos de PCR cuantitativa (del Puerto et al., 2012), esto favorece que en condiciones fisiológicas, los efectos dependientes del receptor P2Y1 dominen sobre los del receptor P2Y13, a pesar de tener un agonista común. Por tanto, durante el proceso de formación de redes neuronales, los niveles de expresión de los receptores P2Y1 y P2Y13 en las neuronas podrían ser determinantes para conseguir una correcta regulación del proceso de elongación axonal.

En la misma línea experimental, observamos que la influencia negativa del ATP a través del receptor P2X7 es dominante sobre el efecto positivo promovido por el ADP y el receptor P2Y1 durante el proceso de elongación axonal (**Fig. R10**). Asimismo, el incremento de longitud axonal dependiente de la inhibición o supresión génica del receptor P2X7 predomina sobre los efectos asociados a la inhibición del receptor P2Y1 (**Fig. R11**) e incluso, la sobreexpresión del receptor P2Y13 (del Puerto et al., 2012). A la luz de estos resultados entendemos, que en condiciones fisiológicas, en ausencia de elevadas concentraciones de ATP, el ADP y la actividad del receptor P2Y1 son suficientes y necesarios para promover el crecimiento axonal, mientras que la actividad del receptor P2Y13 modula de forma negativa este proceso. En este sentido, tanto las variaciones en la expresión de los diferentes receptores como la concentración de los nucleótidos extracelulares implicados, podría ser determinante durante el proceso de elongación axonal en condiciones fisiológicas. En este aspecto la actividad de las enzimas ectonucleotidasas adquiere un papel importante, puesto que regulan la concentración de los diferentes derivados del ATP en el medio extracelular y en este sentido podrían modular el proceso de elongación axonal. De hecho, en un artículo reciente, la expresión de fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNAP), que reduce los niveles extracelulares de ATP, promueve un incremento de la longitud axonal en neuronas en cultivo (Diez-Zaera et al., 2011). Sin embargo, está ampliamente descrito que en condiciones patológicas, tras un proceso de daño neuronal, la concentración de ATP en el medio extracelular puede elevarse hasta el rango de milimolar, debido a su liberación por parte de las células adyacentes como resultado del daño celular (Franke et al., 2006b). En estas condiciones, dichas concentraciones de ATP extracelular activan el receptor P2X7 regulando de forma negativa el crecimiento axonal. Todas estas premisas sugieren, que tanto los receptores P2Y1, P2Y13 y P2X7 como las enzimas ectonucleotidasas podrían ser buenas dianas terapéuticas a la hora de regenerar axones dañados en condiciones patológicas. De hecho, en los últimos años, el sistema de señalización purinérgico está siendo estudiado en profundidad en procesos de regeneración tras el daño neuronal y cada vez aparecen más estudios relacionados que analizaremos en apartados posteriores.



## 2. AMPc Y ADENILATO CICLASA 5 COMO PUNTO COMÚN EN LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE P2Y1, P2Y13 Y P2X7 DURANTE EL PROCESO DE ELONGACIÓN AXONAL.

En este estudio hemos descrito que los tres receptores purinérgicos estudiados P2Y1, P2Y13 y P2X7, regulan el crecimiento axonal de forma coordinada a través de una vía de señalización intracelular cuyo elemento común es la modulación la concentración de AMPc mediada por AC5 y en último término la regulación de la vía de PI3K/AKT/GSK3 $\alpha\beta$ , unas de las vías de señalización principales responsables del proceso de elongación axonal (Garrido et al., 2007; Shi et al., 2003).

### 2.1. Los receptores purinérgicos y el AMPc durante el proceso de elongación axonal.

En la bibliografía está ampliamente descrita la estrecha relación que existe entre el AMPc y el proceso de axonogénesis y elongación axonal durante el desarrollo del sistema nervioso y en condiciones patológicas. Concretamente, en nuestra cuantificación de AMPc intracelular en neuronas hipocampales observamos que tanto la activación del receptor P2Y1, como la inhibición del receptor P2X7 inducen un incremento de la concentración de AMPc intracelular en la zona más distal del axón promoviendo un incremento en el crecimiento axonal a través de la activación de la enzima PKA (**Figs. R16 y R20**). Este resultado se ve apoyado por nuestros datos que muestran que la modificación de los niveles de AMPc intracelular con inhibidores de adenilato ciclasa, de fosfodiesterasas y un antagonista de AMPc, interfiere en el efecto de los receptores purinérgicos en el proceso de elongación axonal (**Figs. R15 y R16**). Asimismo, estudios anteriores describen que el AMPc, a través de la activación de PKA, es fundamental para que tenga lugar el crecimiento neurítico en motoneuronas (Aglah et al., 2008). También sabemos que tres receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G (GPR3, GPR6 y GPR12) promueven el incremento de los niveles de AMPc y el crecimiento de neuritas en neuronas granulares de cerebelo en cultivo (Tanaka et al., 2007), apoyando nuestros resultados firmemente. Finalmente, el laboratorio de Mu-Ming Poo ha demostrado el papel del AMPc en el proceso de axonogénesis en neuronas hipocampales a través de la activación de PKA y la vía de señalización de PI3K/AKT/GSK3 (Shelly et al., 2007; Shelly and Poo, 2011); mientras que el GMPc inhibe este proceso induciendo la formación de dendritas (Shelly et al., 2011). En este mismo modelo, el aumento de la concentración de AMPc supone un descenso de la concentración de GMPc y viceversa en neuritas inmaduras, gracias a la activación de fosfodiesterasas y enzimas específicas, permitiendo que el proceso de polaridad neuronal esté estrechamente regulado gracias a las variaciones en la concentración de estos segundos mensajeros (Shelly et al., 2010).

El papel del AMPc en el proceso de elongación axonal no solo ha sido estudiado durante el desarrollo neuronal, sino que suscita un gran interés en estudios de regeneración axonal en condiciones patológicas. Atendiendo a la bibliografía, sabemos que el AMPc induce un incremento en el crecimiento axonal favoreciendo el proceso de regeneración axonal en células ganglionares de retina (Rodger et al., 2005), y en axones dañados de *C. elegans* (Ghosh-Roy et al., 2010). Un caso especial es el proceso de regeneración axonal en neuronas de la medula espinal; tras un daño moderado, el tratamiento con AMPc, favorece el crecimiento axonal, la mielinización de axones y la recuperación funcional (Lu et al., 2004; Pearse et al., 2004). Como hemos descrito anteriormente, el AMPc se sintetiza en la célula gracias a la actividad de la enzima adenilato ciclasa y se degrada mediante la acción de fosfodiesterasas intracelulares. En nuestros resultados observamos que la inhibición de las fosfodiesterasas 4B y D bloquea el crecimiento axonal asociado a la regulación purinérgica (**Fig. R16**). En este sentido, diferentes inhibidores de fosfodiesterasas están siendo estudiados como posibles terapias

de regeneración axonal tras el daño en la medula espinal. Más concretamente, el *Rolipram*, un inhibidor específico de fosfodiesterasa 4, induce el incremento de AMPc intracelular favoreciendo el crecimiento axonal y la mielinización, llegando a recuperar la funcionalidad motora tras un daño moderado en la medula espinal (Costa et al., 2013; Nikulina et al., 2004; Pearse et al., 2004). Finalmente, este inhibidor de fosfodiesterasa 4, también ha sido relacionado con mejoras en el daño axonal y la tasa de muerte neuronal generado tras un trauma cerebral (Atkins et al., 2007).

## 2.2. Papel de la adenilato ciclasa 5 (AC5) en la coordinación de la señalización purinérgica en el proceso de elongación axonal.

El modelo de regulación de la elongación axonal descrito en este estudio muestra la importancia del AMPc y el  $Ca^{2+}$ , en la fisiología neuronal. Por tanto la adenilato ciclasa, capaz de coordinar la acción de los receptores P2Y1, P2Y13 y P2X7, puede ser regulada de forma positiva o negativa por las vías de señalización de los receptores P2Y y de forma negativa por el calcio intracelular. Nuestros datos muestran que el receptor P2Y1 actúa a través de proteínas  $G_q$ , mientras que el receptor P2Y13 lo hace a través de proteínas  $G_i$ . Además, la activación del receptor P2X7 permite el incremento de la concentración de calcio intracelular hasta concentraciones submicromolares. Basándonos en estos datos, la única adenilato ciclasa que cumple las condiciones es la adenilato ciclasa 5 (AC5). La regulación de AC5 está ampliamente descrita, las proteínas  $G_q$  activan AC5 a través de PLC y PKC $\alpha$  o PKC $\zeta$  (Willoughby and Cooper, 2007) presentando una mayor afinidad por PKC $\zeta$  (Kawabe et al., 1994). Tradicionalmente, el mecanismo de activación más aceptado de PKC $\zeta$  es dependiente de componentes lipídicos como el PIP $_3$  producido por PI3K, sin embargo también está descrito que PKC $\zeta$  puede activarse por el diacil-glicerol (DAG) producido por proteína  $G_q$ /PLC (van Dijk et al., 1997). Además, recientemente se ha descrito que PKC $\zeta$  se asocia a proteínas  $G\alpha_q$  formando un complejo tras la activación de receptores acoplados a proteínas G (García-Hoz et al., 2010). En nuestro modelo, el péptido inhibidor de PKC $\zeta$  inhibe el efecto de crecimiento axonal mediado por la activación del receptor P2Y1, observándose axones más cortos, sin embargo, dicha inhibición no se produce cuando activamos adenilato ciclasa con forskolina (del Puerto et al., 2012), lo que sitúa a PKC $\zeta$  encima de AC5 en la vía de señalización del receptor P2Y1. Por otro lado AC5 es inhibida por proteínas  $G_i$  (Willoughby and Cooper, 2007), en nuestros resultados observamos que la inhibición de proteína  $G_i$  con toxina pertúsica bloquea los efectos de reducción axonal dependientes del inhibidor de AC5 (Fig. R18) y de la sobre-expresión del receptor P2Y13 (Fig. R13), lo que nos permite concluir que el receptor P2Y13 activa proteínas  $G_i$  que inhiben AC5. Esta regulación recíproca de AC5 mediada por P2Y1/ $G_q$  y P2Y13/ $G_i$  justifica, desde el punto de vista de la señalización intracelular, los efectos antagónicos que observamos entre el receptor P2Y1 y P2Y13 durante el proceso de elongación axonal.

Finalmente, AC5 es una isoforma que se regula de forma negativa por concentraciones sub-micromolares de  $Ca^{2+}$ , que compite con el  $Mg^{+2}$  por el sitio catalítico de AC5 (Cooper, 2003; Guillou et al., 1999; Hu et al., 2002), como aquellas que produce la activación del receptor P2X7 (Fig. O1 y R4). Esto sugiere que el ATP podría estar inhibiendo AC5 a través de la entrada de  $Ca^{2+}$  reduciendo los niveles de AMPc y, por tanto, regulando de forma negativa el crecimiento axonal. De hecho en nuestros resultados observamos que tanto la inhibición, como la supresión de AC5, bloquean el crecimiento mediado por el tratamiento con el antagonista del receptor P2X7 (Figs. R18 y R19). Por último, en nuestro estudio tanto el uso de un inhibidor altamente selectivo de AC5 (NKY80), como la expresión de ARNs de interferencia de AC5, impiden los efectos de crecimiento axonal promovidos por el ADP y la inhibición del receptor P2X7 en neuronas hipocampales (Figs. R18 y R19).

La enzima AC5 es una isoforma de adenilato ciclasa cuyo mRNA se expresa en estriado e hipocampo en el

cerebro adulto (Kheirbek et al., 2009), aumentando su expresión en hipocampo durante el desarrollo postnatal a partir del día 14 (Matsuoka et al., 1997). En nuestro modelo de estudio, observamos que AC5 se localiza en el dominio somatodendrítico y en el axón, formando un gradiente creciente hacia el cono de crecimiento axonal (**Fig. R17**), un patrón de expresión similar al observado en adenilato ciclasa (Mizumashi et al., 2001), PKA (Sato et al., 2002) y en los receptores purinérgicos estudiados (**Figs R5 y R6**).

Estudios en el ratón deficiente en AC5 demuestran que esta enzima está implicada en el aprendizaje dependiente del estriado y en la plasticidad corticoestriatal (Kheirbek et al., 2009), y en procesos de ansiedad y depresión (Kim et al., 2008; Krishnan et al., 2008). Además la deficiencia en AC5 impide el aprendizaje Pavloviano (Kheirbek et al., 2010). El ratón deficiente en AC5 también muestra reducción del dolor en un modelo de dolor neuropático (Kim et al., 2007), proceso en el cuál están implicados los receptores P2Y1 y P2Y13 con efectos antagónicos (Malin and Molliver, 2010).

### 2.3. Receptores purinérgicos, y la vía de PI3K/AKT/GSK3 $\alpha\beta$ como reguladores de la elongación axonal.

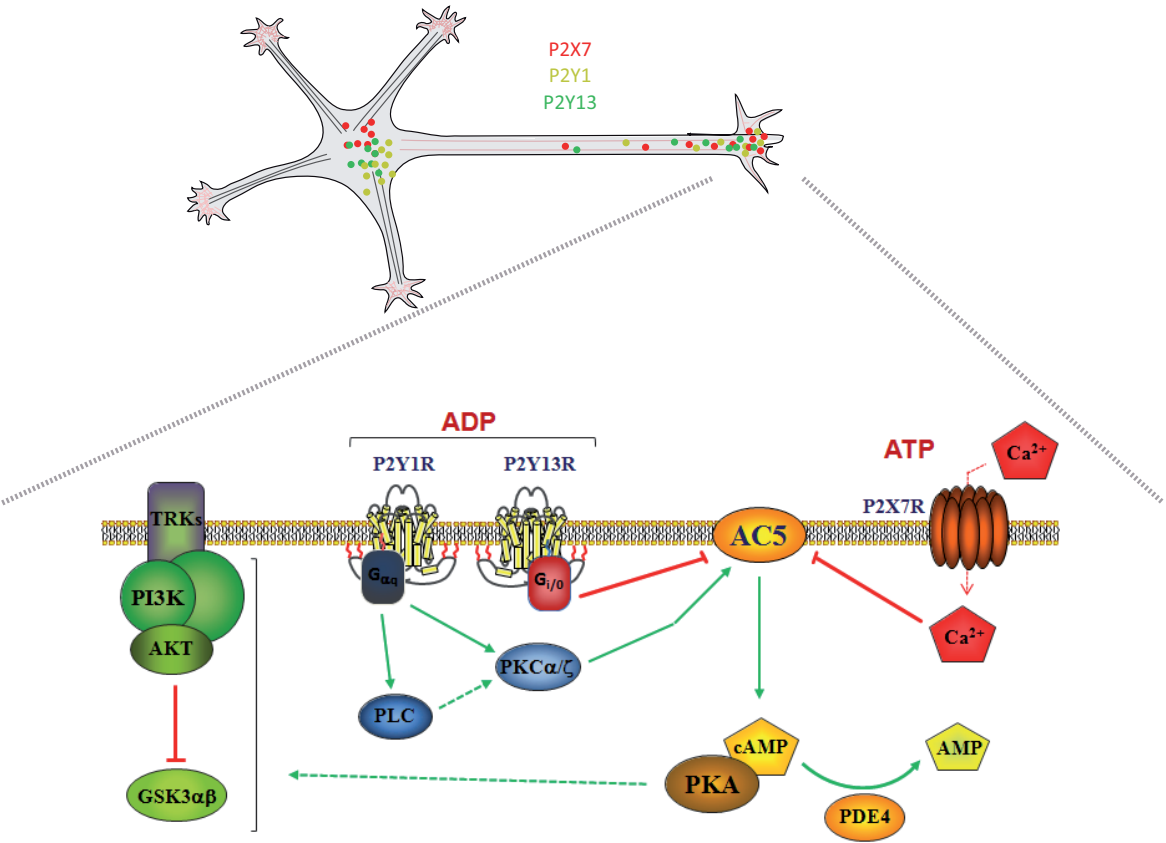
La señalización mediada por los receptores purinérgicos estudiados modula la velocidad de crecimiento axonal, aunque en ningún caso impiden la formación de un axón, lo que plantea la posibilidad de que estos receptores estén regulando la vía principal que regula el proceso de axonogénesis y elongación axonal, es decir, la vía de PI3K/AKT/GSK3 $\alpha\beta$ .

La actividad de PI3K es necesaria para que tenga lugar el proceso de axonogénesis y haya una correcta elongación axonal (Shi et al., 2003). En nuestros resultados observamos que la inhibición de PI3K bloquea el efecto de crecimiento axonal mediado por ADP y la inhibición de los receptores P2Y13 y P2X7 (**Fig. R21**). Además, estos tratamientos inducen la fosforilación de los sustratos de PI3K como AKT y GSK3, activando AKT e inhibiendo GSK3 (**Fig. R22**). La forma fosforilada de AKT está presente en el cono de crecimiento y ha sido relacionada con la formación del axón (Schwamborn and Puschel, 2004). El incremento en la fosforilación en AKT induce la inhibición de GSK3 gracias a la fosforilación en sus residuos de serina 9 o 21, produciendo un incremento en la longitud en neuronas de ganglio de raíz dorsal (Zhou et al., 2004) y un aumento de la longitud y ramificación axonal en neuronas de hipocampo (Garrido et al., 2007). De hecho, en nuestros resultados observamos que la inhibición de GSK3 impide la reducción de longitud axonal inducida por el ATP y la inhibición del receptor P2Y1 (**Fig. R21**).

En consecuencia, nuestros resultados indican que los receptores purinérgicos modulan la vía de PI3K/AKT/GSK3 para modular en mayor o menor medida la tasa de elongación axonal. Sin embargo, sería necesario estudiar en mayor profundidad las redes de señalización intracelular reguladas por los receptores purinérgicos para dilucidar la interconexión entre AC5, AMPc, PKA y la vía de PI3K. Asimismo, no podemos descartar la implicación de otras vías de señalización paralelas en la regulación de la elongación axonal en neuronas hipocámpales mediada por los receptores purinérgicos. Aún así, es interesante destacar que en ningún caso bloqueamos el proceso de axonogénesis, es decir, la vía de PI3K/AKT/GSK3 no se inhibe completamente, por lo que el efecto de los receptores purinérgicos es única y exclusivamente modulador, lo que puede ser de gran interés a la hora de diseñar abordajes terapéuticos.

Finalmente, a la luz de nuestros resultados, proponemos un modelo (**Fig D1**) en el que 3 receptores purinérgicos, los receptores P2Y1, P2Y13 y P2X7 regulan el proceso de elongación axonal en respuesta a cambios en la concentración de nucleótidos de adenina extracelulares, el ATP y el ADP. Estos receptores purinérgicos regulan de forma coordinada en diferentes sentidos la actividad de AC5 y la concentración

de AMPc intracelular en el cono de crecimiento axonal, permitiendo la modulación de la vía de PI3K/AKT/GSK3 produciendo cambios en la velocidad de crecimiento axonal en nuestro modelo de cultivo. Por ello, sugerimos el diseño de agonistas y antagonistas específicos dirigidos a favorecer el crecimiento axonal para tratar patologías asociadas a la pérdida de conexiones sinápticas y daño axonal, permitiendo la llegada de axones a la zona dañada y la recuperación de las sinapsis perdidas.



**Fig. D1.** Modelo que describe la localización de los receptores P2Y1, P2Y13 y P2X7 en neuronas hipocámpicas y las vías de señalización que coordinan en el cono de crecimiento para modular el proceso de elongación axonal.

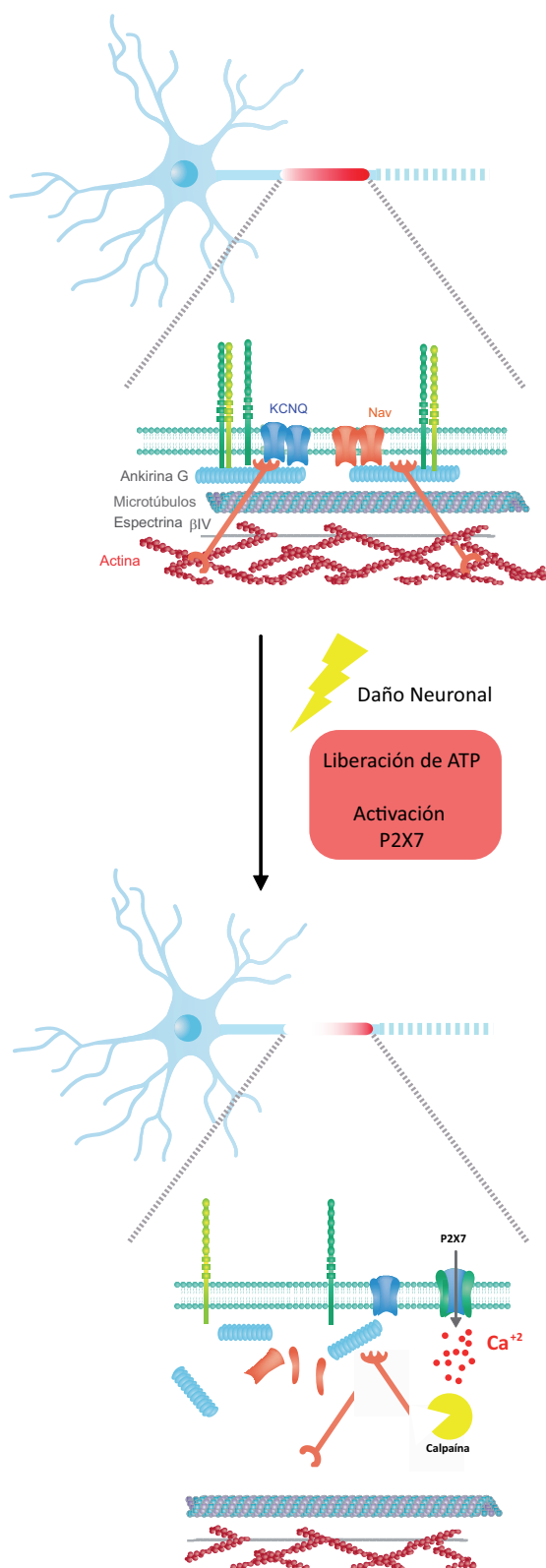
### 3. FUNCIÓN DEL RECEPTOR P2X7 EN EL MANTENIMIENTO DE LA INTEGRIDAD DEL SEGMENTO INICIAL DEL AXON Y LA REGULACION DE LA EXCITABILIDAD NEURONAL.

A medida que avanzamos en este estudio, nos interesamos por la implicación de los receptores purinérgicos, concretamente en el receptor P2X7, en etapas posteriores del desarrollo neuronal, centrándonos en la regulación del SIA y los posibles cambios en la excitabilidad neuronal. Asimismo, estudiamos su posible implicación en condiciones patológicas utilizando un modelo de isquemia transitoria.

#### 3.1. El receptor P2X7 como regulador del SIA y la excitabilidad neuronal.

Como hemos descrito en apartados anteriores, el SIA es una estructura clave en cuanto a la fisiología de la neurona. Además de mantener la polaridad neuronal en dos dominios diferenciados morfológica y funcionalmente, y de funcionar como una barrera de difusión que controla el tráfico hacia el axón (Song et al., 2009), es la estructura donde se generan los potenciales de acción (Kole et al., 2008). En este sentido, su papel en la generación y modulación del potencial de acción viene dado por la alta concentración en canales de sodio, potasio y calcio dependientes de voltaje en este dominio (Bender and Trussell, 2012) y por su plasticidad, que consiste en que el SIA puede desplazarse y modificar su longitud para modular las señales recibidas desde el soma (Grubb and Burrone, 2010; Kuba et al., 2010). Por ejemplo, tras el daño sufrido en el cerebro por una onda expansiva, los segmentos iniciales en neuronas hipocampales y corticales sufren un acortamiento (Baalman et al., 2013); por otro lado, la pérdida de conectividad en neuronas auditivas aviares induce una elongación del SIA y una redistribución de los canales de sodio (Kuba et al., 2010). En cuanto a la formación y mantenimiento de esta estructura, sabemos que los canales de sodio y el canal de potasio Kv7 se unen al SIA gracias a un motivo aminoacídico que interacciona con ankirina G y los retiene en el SIA (Garrido et al., 2003; Pan et al., 2006), mientras que otros canales como los Kv1 se unen al SIA gracias a proteínas de anclaje como PSD-93 (Ogawa et al., 2008). Estudios recientes, describen que algunas quinasas en el SIA pueden regular la concentración de canales de sodio. La actividad de caseína quinasa 2 (CK2) es necesaria para concentrar ankirina G y canales de sodio en el SIA (Brechet et al., 2008; Sanchez-Ponce et al., 2011) pudiendo fosforilar *in vitro* el motivo de unión a ankirina G en los canales de sodio (Brechet et al., 2008). Por otro lado, la actividad de GSK3 $\alpha\beta$ , junto con  $\beta$ -catenina, son necesarias para mantener la concentración de ankirina G y canales de sodio en el SIA (Tapia et al., 2013), mientras que la quinasa dependiente de ciclina 5 (Cdk5) modula la unión del complejo Kv1/Kv $\beta$ 2 a su membrana (Vacher et al., 2011). A pesar de ello, tenemos poca información acerca de los mecanismos celulares y moleculares que modulan la expresión funcional de los canales iónicos en el SIA en respuesta de cambios fisiológicos o patológicos.

Un estudio anterior demuestra que tras un proceso de isquemia hay una pérdida de segmentos iniciales en neuronas corticales (Schafer et al., 2009), y está ampliamente descrito que los procesos de daño neuronal conllevan una liberación masiva de ATP (Melani et al., 2005), lo que sugiere que el receptor P2X7 podría estar regulando la expresión de proteínas del SIA en condiciones patológicas. En primer lugar, nuestro abordaje *in vitro* muestra que tanto altas concentraciones de ATP, como la sobre-expresión del receptor P2X7 inducen una reducción en la concentración de ankirina G y canales de sodio en el SIA de neuronas hipocampales plenamente desarrolladas (Fig. R23 y R25), que no se produce con el tratamiento combinado con el inhibidor de P2X7 (Fig. R24) o en neuronas que expresan su vector de interferencia (Fig. R27). Incluso 3 horas de tratamiento con BBG tras un tratamiento de 24h con ATP es suficiente para recuperar la concentración de ankirina G y canales de sodio en el SIA (Fig. 36), lo que indica que la modulación del receptor P2X7 puede generar cambios en el SIA que puedan modular la excitabilidad neuronal en condiciones fisiológicas. En este sentido, nuestros estudios electrofisiológicos en rodajas de cerebro de ratón demuestran una reducción de



**Fig. D2.** Modelo que describe los mecanismos intracelulares que regulan la pérdida de concentración de proteínas del SIA descrita para el receptor P2X7 en este estudio.

la excitabilidad neuronal y de la amplitud de la corriente de sodio tras la expresión exógena del receptor P2X7, al igual que la pérdida de proteínas del SIA (**Fig. 35**). De la misma forma, la inhibición del receptor P2X7 en las mismas condiciones induce un incremento de la excitabilidad neuronal y un aumento en la amplitud de la corriente de sodio (**Fig. 34**). Un estudio reciente ha descrito que concentraciones micromolares de BBG (3  $\mu$ M) son capaces de inactivar canales de sodio en células de neuroblastoma (Jo and Bean, 2011), sin embargo, en nuestro estudio utilizamos concentraciones entre 50 nM y 200 nM, dentro del rango de  $IC_{50}$  para el BBG (10-200 nM) para inactivar específicamente el receptor P2X7 (Jiang et al., 2000). Nuestros experimentos muestran que la actividad del receptor P2X7 puede modular la estructura del SIA controlando la concentración de canales de sodio dependientes de voltaje, afectando a la excitabilidad neuronal. Hasta el momento es conocida la función neuromoduladora del ATP en diferentes tipos celulares y estructuras cerebrales en condiciones fisiológicas. Concentraciones fisiológicas de ATP son liberadas por neuronas y astrocitos pudiendo modular la actividad neuronal activando receptores P2X extra-sinápticos expresados en espinas dendríticas y terminales nerviosos (Fields and Stevens, 2000; Le et al., 1998; Richler et al., 2008; Rubio and Soto, 2001; Vulchanova et al., 1996). Pero no hay evidencia acerca del papel del receptor P2X7 en la generación de potenciales de acción. Experimentos iniciales muestran que el ATP despolariza neuronas (Jahr and Jessell, 1983; Krishtal et al., 1983) abriendo canales iónicos (Benham and Tsien, 1987; Kolb and Wakelam, 1983), mediando transmisión sináptica en el sistema nervioso central y periférico (Edwards, 1992; Evans et al., 1992; Silinsky et al., 1992). A pesar de estos ejemplos de regulación de la actividad neuronal mediada por el sistema purinérgico, los mecanismos moleculares y celulares implicados, así como su participación en condiciones patológicas son desconocidos, por lo que estudios adicionales son necesarios en este sentido.

El siguiente paso en nuestro estudio fue intentar dilucidar los mecanismos moleculares que controla el receptor P2X7 para regular la expresión de las proteínas del SIA. En este sentido, un estudio demuestra el papel del calcio y calpaína durante un proceso de daño en el SIA inducido por privación de oxígeno y glucosa en neuronas



hipocampales (Schafer et al., 2009). Nuestros datos confirman la implicación del calcio en la modulación de la expresión de proteínas del SIA (**Figs. R28-R31**), y demuestran que los receptores P2X7 funcionales están implicados en la regulación de la entrada de calcio y de la función de calpaína en este dominio, promoviendo la degradación de sus proteínas (**Figs. R32 y R33**). La entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  a través de los canales de calcio voltaje-dependiente de tipo L, está implicada en el desplazamiento del SIA desde el soma (Grubb and Burrone, 2010), aunque no se producen cambios en la expresión de sus proteínas, lo que sugiere que estos canales de  $\text{Ca}^{+2}$  no están implicados en el proceso que describimos en nuestro estudio. Además, un estudio reciente demuestra que el desplazamiento del SIA es dependiente de calcineurina, una fosfatasa dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$  y no de calpaína (Evans et al., 2013). En nuestros resultados no observamos ningún desplazamiento del SIA, por lo que todos estos datos sugieren que la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  por diferentes mecanismos puede modular la estructura, plasticidad y función del SIA utilizando diferentes vías de señalización. En cuanto a la calpaína, la activación del receptor P2X7 permite la entrada un flujo mantenido de  $\text{Ca}^{+2}$ , incrementando su concentración intracelular (Carrasquero et al., 2009), y permitiendo la activación de calpaína observada en nuestro estudio. De hecho, la muerte celular asociada con altas concentraciones extracelulares de  $\text{Ca}^{+2}$  (10 mM) y el receptor P2X7, pueden ser bloqueadas con inhibidores de calpaína (Nishida et al., 2012). Estudios recientes han mostrado que  $\beta$ IV-espectrina, ankirina G y los canales de sodio dependientes de voltaje son sustratos de calpaína (Schafer et al., 2009; von Reyn et al., 2009), lo que explica la reducción de expresión de estas proteínas observadas en nuestro estudio y el hecho de que su expresión se recupere con inhibidores de calpaína (**Fig. R32 y R33**). Asimismo, la inyección intraperitoneal del inhibidor de calpaína MDL-28170, utilizado en nuestro estudio, protege el SIA de su degradación tras un proceso de isquemia cerebral (Schafer et al., 2009). Finalmente, también se ha descrito una activación sostenida de calpaína en enfermedades neurodegenerativas, como Parkinson, Alzheimer o Huntington (Vosler et al., 2008) y tras daño cerebral o en la médula espinal (Kampfl et al., 1996; Ray et al., 2003).

Todos estos resultados *in vitro* nos acercan a la comprensión de los mecanismos moleculares que subyacen en la función del SIA y pueden ser de gran utilidad a la hora de diseñar tratamientos para compensar posibles daños en el cerebro y la pérdida de funciones cognitivas asociadas a diferentes patologías del sistema nervioso.

### 3.2. Papel del receptor P2X7 en el mantenimiento del SIA tras isquemia cerebral.

Una vez conocidos los mecanismos moleculares por los que el receptor P2X7 regula la degradación de proteínas del SIA, estudiamos los posibles efectos de su antagonista, BBG, como posible tratamiento para recuperar la expresión de proteínas del SIA y su funcionalidad en un modelo de isquemia transitoria producido por la oclusión de la arteria medial cerebral (tMCAO).

Publicaciones anteriores han demostrado una alta liberación de ATP en el estriado de ratas sometidas a procesos de isquemia cerebral (Melani et al., 2005) y además, la inyección intraperitoneal de ATP 4 mM incrementa el daño cerebral tras la isquemia (Zhang et al., 2013). En la misma línea, la expresión y la actividad de las ectonucleotidasas parece jugar un papel protector contra el daño cerebral (Melani et al., 2012), al igual que los antagonistas PPADS y BBG que relacionan la inhibición de los receptores P2X en general y el receptor P2X7, respectivamente, con la protección de las neuronas contra el daño isquémico (Arbeloa et al., 2012; Lammer et al., 2006). Además, la actividad del receptor P2X7 humano puede ser inhibida por el  $17\beta$ -oestradiol (Cario-Toumaniantz et al., 1998), que ha sido descrito como un protector natural contra la isquemia (Perez-Alvarez et al., 2012).

Nuestros resultados muestran que el antagonista del receptor P2X7, BBG, protege parcialmente la estructura



del SIA impidiendo la degradación de ankirina G y  $\beta$ IV-espectrina tras un proceso de isquemia transitoria, manteniendo la concentración de estas proteínas concentradas en el SIA (**Fig. 37**). La pérdida o reducción de ankirina G en el SIA impide la concentración de canales de sodio y canales de potasio Kv7 en esta estructura, puesto que funciona como su proteína de anclaje (Garrido et al., 2003; Pan et al., 2006).

En cuanto a cambios en la expresión de P2X7 tras un proceso de isquemia, diferentes autores difieren en sus conclusiones en función de su modelo de estudio. Por ejemplo, el ARN mensajero y la expresión del receptor aumenta en cultivos organotípicos de hipocampo (Cavaliere et al., 2004) y en neuronas corticales en cultivo tras 12 h de daño, sin embargo no se observaron cambios en neuronas corticales en cultivo 2h después del estímulo isquémico (Milius et al., 2008). Nuestros resultados no detectan ningún cambio apreciable a nivel inmunohistoquímico en neuronas tras la isquemia, pero la expresión exógena de P2X7 es suficiente para afectar a la organización del SIA. Sin embargo, un estudio anterior ha demostrado que incluso sin observar un incremento en su expresión, el receptor P2X7 muestra un aumento en su respuesta al ATP tras el daño isquémico (Wirkner et al., 2005).

Las modificaciones en la concentración de canales iónicos en el SIA han sido relacionadas con enfermedades genéticas como el síndrome Angelman, caracterizado por epilepsia, autismo o desórdenes motores, entre otros síntomas. En un modelo del síndrome de Angelman se muestra un aumento de expresión de ankirina G y de canales de sodio (Kaphzan et al., 2011), lo que puede explicar algunos síntomas observados en dicho síndrome. Por otro lado, el receptor P2X7 no sólo está relacionado con el daño generado tras el proceso de isquemia cerebral, sino que su actividad ha sido relacionada con diversas enfermedades neurodegenerativas. Se ha detectado un incremento en la expresión del receptor P2X7 alrededor de las placas de  $\beta$ -amiloide (Parvathenani et al., 2003), y la inhibición mantenida del receptor P2X7 con BBG reduce su número en un modelo de la enfermedad de Alzheimer (Diaz-Hernandez et al., 2012). Además, la ganancia de función de P2X7 por mutaciones puntuales detectadas en el receptor P2X7 humano se ha relacionado con la esclerosis múltiple (Oyanguren-Desez et al., 2011). El receptor P2X7 parece jugar también un papel en desordenes neuropsiquiátricos como la epilepsia, estudios recientes muestran que la inhibición del receptor P2X7 reduce las convulsiones generadas tras el tratamiento con kainato (Engel et al., 2012). Finalmente, las diferentes mutaciones o polimorfismos múltiples de nucleótido único detectados en humanos en el gen de P2X7, abren multitud de vías de investigación acerca de la implicación del receptor P2X7 en diversas enfermedades.

En conclusión, nuestros resultados muestran el papel del receptor purinérgico P2X7 en la modulación del SIA y la excitabilidad neuronal, a través de un mecanismo molecular mediado por calcio y la activación de calpaínas. Además la inhibición de este receptor permite la recuperación de los segmentos iniciales degradados tras el daño isquémico. Ello implica al sistema purinérgico en la regulación de la excitabilidad neuronal y su posible implicación en diversas enfermedades neuropsiquiátricas, y abre un abanico enorme de vías de investigación que estudien los posibles efectos del sistema purinérgico en la regulación del SIA tanto en condiciones fisiológicas como en procesos patológicos.

## ***Conclusiones***

---



1. El receptor purinérgico ionotrópico P2X7 se localiza en el soma y en el axón de neuronas de hipocampo en cultivo aumentando su expresión de forma progresiva hacia la zona más distal del axón. En esta zona se produce la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  a través del receptor P2X7 tras la activación por ATP.
2. Concentraciones extracelulares de ATP necesarias para la activación del receptor purinérgico P2X7, modulan negativamente el crecimiento axonal en neuronas de hipocampo en cultivo, mientras que el ADP extracelular promueve un incremento significativo de la longitud axonal.
3. En neuronas de hipocampo se expresan dos receptores purinérgicos metabotrópicos activados por ADP, P2Y1 y P2Y13, que se localizan igualmente en el soma y en el axón formando un gradiente creciente hacia el cono de crecimiento axonal. Mientras el receptor P2Y1 promueve un incremento en la elongación axonal, el receptor P2Y13 es un modulador negativo del proceso de elongación axonal en neuronas hipocámpales.
4. El efecto de reducción de la longitud axonal promovido por una elevada concentración de ATP extracelular a través del receptor P2X7, predomina sobre los efectos dependientes del ADP y los receptores purinérgicos P2Y1 y P2Y13 durante el proceso de elongación axonal. Por tanto, el balance de la concentración extracelular de ATP y ADP condiciona la modulación de la elongación axonal por los receptores purinérgicos.
5. La coordinación de estos tres receptores se produce a través de sus vías de señalización que convergen en la adenilato ciclasa 5 (AC5) durante el desarrollo axonal, modificando la concentración de AMPc intracelular en el cono de crecimiento axonal.
6. La modulación de los niveles de AMPc intracelular por los receptores P2Y1, P2Y13 y P2X7 controla la actividad de PKA y finalmente la vía de señalización de PI3K/AKT/GSK3 $\alpha\beta$ , esencial en el proceso de elongación axonal.
7. En etapas posteriores del desarrollo axonal relacionadas con su función en la generación y transmisión de impulsos eléctricos, altas concentraciones de ATP extracelular o un aumento de la expresión del receptor P2X7 promueven una reducción significativa de la concentración de  $\beta$ IV-espectrina, ankirina G y canales de sodio en el segmento inicial del axón. La inhibición del receptor P2X7 con BBG es capaz de recuperar de nuevo la concentración de estas proteínas en el segmento inicial del axón.
8. La menor concentración de proteínas del segmento inicial del axón se produce por la entrada de calcio a través del receptor P2X7 y la activación de la proteasa calpaína, capaz de degradar  $\beta$ IV-espectrina, ankirina G y canales de sodio.
9. La pérdida de canales de sodio dependientes de voltaje en el segmento inicial del axón mediada por la activación del receptor P2X7, conduce a una menor amplitud de la corriente de sodio y una reducción muy significativa de la excitabilidad neuronal.
10. En un modelo de isquemia en rata, mediante la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO), la inhibición del receptor purinérgico P2X7 con BBG en las primeras horas de daño, reduce la pérdida de los segmentos iniciales dañados observada en este modelo de isquemia.



## ***Bibliografía***

---





- Abbracchio, M.P., and G. Burnstock. 1994. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther.* 64:445-475.
- Abbracchio, M.P., and G. Burnstock. 1998. Purinergic signalling: pathophysiological roles. *Jpn J Pharmacol.* 78:113-145.
- Abbracchio, M.P., G. Burnstock, J.M. Boeynaems, E.A. Barnard, J.L. Boyer, C. Kennedy, G.E. Knight, M. Fumagalli, C. Gachet, K.A. Jacobson, and G.A. Weisman. 2006. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev.* 58:281-341.
- Abbracchio, M.P., G. Burnstock, A. Verkhratsky, and H. Zimmermann. 2009. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci.* 32:19-29.
- Adriouch, S., C. Dox, V. Welge, M. Seman, F. Koch-Nolte, and F. Haag. 2002. Cutting edge: a natural P451L mutation in the cytoplasmic domain impairs the function of the mouse P2X7 receptor. *J Immunol.* 169:4108-4112.
- Aglah, C., T. Gordon, and E.I. Posse de Chaves. 2008. cAMP promotes neurite outgrowth and extension through protein kinase A but independently of Erk activation in cultured rat motoneurons. *Neuropharmacology.* 55:8-17.
- Amadio, S., G. Tramini, A. Martorana, M.T. Viscomi, G. Sancesario, G. Bernardi, and C. Volonte. 2006. Oligodendrocytes express P2Y12 metabotropic receptor in adult rat brain. *Neuroscience.* 141:1171-1180.
- Amisten, S., S. Meidute-Abaraviciene, C. Tan, B. Olde, I. Lundquist, A. Salehi, and D. Erlinge. 2010. ADP mediates inhibition of insulin secretion by activation of P2Y13 receptors in mice. *Diabetologia.* 53:1927-1934.
- Andersen, S.S., and G.Q. Bi. 2000. Axon formation: a molecular model for the generation of neuronal polarity. *Bioessays.* 22:172-179.
- Anderson, C.M., and M. Nedergaard. 2006. Emerging challenges of assigning P2X7 receptor function and immunoreactivity in neurons. *Trends Neurosci.* 29:257-262.
- Ando, R.D., and B. Sperlagh. 2012. The role of glutamate release mediated by extrasynaptic P2X7 receptors in animal models of neuropathic pain. *Brain Res Bull.*
- Andries, M., P. Van Damme, W. Robberecht, and L. Van Den Bosch. 2007. Ivermectin inhibits AMPA receptor-mediated excitotoxicity in cultured motor neurons and extends the life span of a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis.* 25:8-16.
- Anthony, T.E., C. Klein, G. Fishell, and N. Heintz. 2004. Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system. *Neuron.* 41:881-890.
- Arbeloa, J., A. Perez-Samartin, M. Gottlieb, and C. Matute. 2012. P2X7 receptor blockade prevents ATP excitotoxicity in neurons and reduces brain damage after ischemia. *Neurobiol Dis.* 45:954-961.
- Arimura, N., and K. Kaibuchi. 2007. Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nat Rev Neurosci.* 8:194-205.
- Armstrong, J.N., T.B. Brust, R.G. Lewis, and B.A. MacVicar. 2002. Activation of presynaptic P2X7-like receptors depresses mossy fiber-CA3 synaptic transmission through p38 mitogen-activated protein kinase. *J Neurosci.* 22:5938-5945.
- Arthur, D.B., S. Georgi, K. Akassoglou, and P.A. Insel. 2006. Inhibition of apoptosis by P2Y2 receptor activation: novel pathways for neuronal survival. *J Neurosci.* 26:3798-3804.
- Asada, N., K. Sanada, and Y. Fukada. 2007. LKB1 regulates neuronal migration and neuronal differentiation in the developing neocortex through centrosomal positioning. *J Neurosci.* 27:11769-11775.
- Atkins, C.M., A.A. Oliva, Jr., O.F. Alonso, D.D. Pearse, H.M. Bramlett, and W.D. Dietrich. 2007. Modulation of the cAMP signaling pathway after traumatic brain injury. *Exp Neurol.* 208:145-158.
- Baalman, K.L., R.J. Cotton, S.N. Rasband, and M.N. Rasband. 2013. Blast wave exposure impairs memory and decreases axon initial segment length. *J Neurotrauma.* 30:741-751.

- Baas, P.W. 2002. Neuronal polarity: microtubules strike back. *Nat Cell Biol.* 4:E194-195.
- Bagnard, D., M. Lohrum, D. Uziel, A.W. Puschel, and J. Bolz. 1998. Semaphorins act as attractive and repulsive guidance signals during the development of cortical projections. *Development.* 125:5043-5053.
- Barberis, C., and H. McIlwain. 1976. 5'-Adenine mononucleotides in synaptosomal preparations from guinea pig neocortex: their change on incubation, superfusion and stimulation. *J Neurochem.* 26:1015-1021.
- Bardoni, R., P.A. Goldstein, C.J. Lee, J.G. Gu, and A.B. MacDermott. 1997. ATP P2X receptors mediate fast synaptic transmission in the dorsal horn of the rat spinal cord. *J Neurosci.* 17:5297-5304.
- Barnard, E.A., G. Burnstock, and T.E. Webb. 1994. G protein-coupled receptors for ATP and other nucleotides: a new receptor family. *Trends Pharmacol Sci.* 15:67-70.
- Baumann, N., and D. Pham-Dinh. 2001. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev.* 81:871-927.
- Beigi, R.D., S.B. Kertesz, G. Aquilina, and G.R. Dubyak. 2003. Oxidized ATP (oATP) attenuates proinflammatory signaling via P2 receptor-independent mechanisms. *Br J Pharmacol.* 140:507-519.
- Bender, K.J., and L.O. Trussell. 2012. The physiology of the axon initial segment. *Annu Rev Neurosci.* 35:249-265.
- Benham, C.D., and R.W. Tsien. 1987. A novel receptor-operated Ca<sup>2+</sup>-permeable channel activated by ATP in smooth muscle. *Nature.* 328:275-278.
- Bianco, F., E. Pravettoni, A. Colombo, U. Schenk, T. Moller, M. Matteoli, and C. Verderio. 2005. Astrocyte-derived ATP induces vesicle shedding and IL-1 beta release from microglia. *J Immunol.* 174:7268-7277.
- Bianchi, B.R., K.J. Lynch, E. Touma, W. Niforatos, E.C. Burgard, K.M. Alexander, H.S. Park, H. Yu, R. Metzger, E. Kowaluk, M.F. Jarvis, and T. van Biesen. 1999. Pharmacological characterization of recombinant human and rat P2X receptor subtypes. *Eur J Pharmacol.* 376:127-138.
- Bito, H., T. Furuyashiki, H. Ishihara, Y. Shibasaki, K. Ohashi, K. Mizuno, M. Maekawa, T. Ishizaki, and S. Narumiya. 2000. A critical role for a Rho-associated kinase, p160ROCK, in determining axon outgrowth in mammalian CNS neurons. *Neuron.* 26:431-441.
- Boiko, T., A. Van Wart, J.H. Caldwell, S.R. Levinson, J.S. Trimmer, and G. Matthews. 2003. Functional specialization of the axon initial segment by isoform-specific sodium channel targeting. *J Neurosci.* 23:2306-2313.
- Bowser, D.N., and B.S. Khakh. 2007. Vesicular ATP is the predominant cause of intercellular calcium waves in astrocytes. *J Gen Physiol.* 129:485-491.
- Boyer, J.L., M. Adams, R.G. Ravi, K.A. Jacobson, and T.K. Harden. 2002. 2-Chloro N(6)-methyl-(N)-methanocarba-2'-deoxyadenosine-3',5'-bisphosphate is a selective high affinity P2Y(1) receptor antagonist. *Br J Pharmacol.* 135:2004-2010.
- Boyer, J.L., A. Mohanram, E. Camaioni, K.A. Jacobson, and T.K. Harden. 1998. Competitive and selective antagonism of P2Y1 receptors by N6-methyl 2'-deoxyadenosine 3',5'-bisphosphate. *Br J Pharmacol.* 124:1-3.
- Bradke, F., and C.G. Dotti. 1997. Neuronal polarity: vectorial cytoplasmic flow precedes axon formation. *Neuron.* 19:1175-1186.
- Bradke, F., and C.G. Dotti. 1999. The role of local actin instability in axon formation. *Science.* 283:1931-1934.
- Brechet, A., M.P. Fache, A. Brachet, G. Ferracci, A. Baude, M. Irondelle, S. Pereira, C. Leterrier, and B. Dargent. 2008. Protein kinase CK2 contributes to the organization of sodium channels in axonal membranes by regulating their interactions with ankyrin G. *J Cell Biol.* 183:1101-1114.
- Bruckner, G., S. Szeoke, S. Pavlica, J. Grosche, and J. Kacza. 2006. Axon initial segment ensheathed by extracellular matrix in perineuronal nets. *Neuroscience.* 138:365-375.
- Buller, K.M., S. Khanna, J.R. Sibbald, and T.A. Day. 1996. Central noradrenergic neurons signal via ATP to elicit vasopressin responses to haemorrhage. *Neuroscience.* 73:637-642.

- Burnstock, G. 1972. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev.* 24:509-581.
- Burnstock, G. 1976. Purinergic receptors. *J Theor Biol.* 62:491-503.
- Burnstock, G. 2007a. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev.* 87:659-797.
- Burnstock, G. 2007b. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci.* 64:1471-1483.
- Burnstock, G. 2008. Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nat Rev Drug Discov.* 7:575-590.
- Burnstock, G. 2009. Purinergic cotransmission. *Exp Physiol.* 94:20-24.
- Burnstock, G., B.B. Fredholm, and A. Verkhratsky. 2011a. Adenosine and ATP receptors in the brain. *Curr Top Med Chem.* 11:973-1011.
- Burnstock, G., U. Krugel, M.P. Abbracchio, and P. Illes. 2011b. Purinergic signalling: from normal behaviour to pathological brain function. *Prog Neurobiol.* 95:229-274.
- Burnstock, G., and H. Ulrich. 2011. Purinergic signaling in embryonic and stem cell development. *Cell Mol Life Sci.* 68:1369-1394.
- Camaioni, E., J.L. Boyer, A. Mohanram, T.K. Harden, and K.A. Jacobson. 1998. Deoxyadenosine bisphosphate derivatives as potent antagonists at P2Y1 receptors. *J Med Chem.* 41:183-190.
- Cario-Toumaniantz, C., G. Loirand, L. Ferrier, and P. Pacaud. 1998. Non-genomic inhibition of human P2X7 purinoceptor by 17beta-oestradiol. *J Physiol.* 508 ( Pt 3):659-666.
- Carrasquero, L.M., E.G. Delicado, D. Bustillo, Y. Gutierrez-Martin, A.R. Artalejo, and M.T. Miras-Portugal. 2009. P2X7 and P2Y13 purinergic receptors mediate intracellular calcium responses to BzATP in rat cerebellar astrocytes. *J Neurochem.* 110:879-889.
- Carrasquero, L.M., E.G. Delicado, A.I. Jimenez, R. Perez-Sen, and M.T. Miras-Portugal. 2005. Cerebellar astrocytes co-express several ADP receptors. Presence of functional P2Y(13)-like receptors. *Purinergic Signal.* 1:153-159.
- Casanovas, A., S. Hernandez, O. Tarabal, J. Rossello, and J.E. Esquerda. 2008. Strong P2X4 purinergic receptor-like immunoreactivity is selectively associated with degenerating neurons in transgenic rodent models of amyotrophic lateral sclerosis. *J Comp Neurol.* 506:75-92.
- Cavaliere, F., S. Amadio, G. Sancesario, G. Bernardi, and C. Volonte. 2004. Synaptic P2X7 and oxygen/glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures. *J Cereb Blood Flow Metab.* 24:392-398.
- Clyne, J.D., L.D. LaPointe, and R.I. Hume. 2002a. The role of histidine residues in modulation of the rat P2X(2) purinoceptor by zinc and pH. *J Physiol.* 539:347-359.
- Clyne, J.D., L.F. Wang, and R.I. Hume. 2002b. Mutational analysis of the conserved cysteines of the rat P2X2 purinoceptor. *J Neurosci.* 22:3873-3880.
- Cockcroft, S., and B.D. Gomperts. 1980. The ATP4- receptor of rat mast cells. *Biochem J.* 188:789-798.
- Coco, S., F. Calegari, E. Pravettoni, D. Pozzi, E. Taverna, P. Rosa, M. Matteoli, and C. Verderio. 2003. Storage and release of ATP from astrocytes in culture. *J Biol Chem.* 278:1354-1362.
- Cohen, J.E., and R.D. Fields. 2008. Activity-dependent neuron-glia signaling by ATP and leukemia-inhibitory factor promotes hippocampal glial cell development. *Neuron Glia Biol.* 4:43-55.
- Collo, G., S. Neidhart, E. Kawashima, M. Kosco-Vilbois, R.A. North, and G. Buell. 1997. Tissue distribution of the P2X7 receptor. *Neuropharmacology.* 36:1277-1283.
- Communi, D., N.S. Gonzalez, M. Detheux, S. Brezillon, V. Lannoy, M. Parmentier, and J.M. Boeynaems. 2001. Identification of a novel human ADP receptor coupled to G(i). *J Biol Chem.* 276:41479-41485.
- Cooper, D.M. 2003. Molecular and cellular requirements for the regulation of adenylate cyclases by calcium. *Biochem Soc Trans.* 31:912-915.
- Costa, L.M., J.E. Pereira, V.M. Filipe, L.G. Magalhaes, P.A. Couto, J.M. Gonzalo-Orden, S. Raimondo, S. Geuna, A.C. Mauricio, E. Nikulina, M.T. Filbin, and A.S. Varejao. 2013. Rolipram promotes functional recovery

after contusive thoracic spinal cord injury in rats. *Behav Brain Res.* 243:66-73.

Cotrina, M.L., J.H. Lin, J.C. Lopez-Garcia, C.C. Naus, and M. Nedergaard. 2000. ATP-mediated glia signaling. *J Neurosci.* 20:2835-2844.

Cruz, D.A., C.L. Weaver, E.M. Lovallo, D.S. Melchitzky, and D.A. Lewis. 2009. Selective alterations in postsynaptic markers of chandelier cell inputs to cortical pyramidal neurons in subjects with schizophrenia. *Neuropsychopharmacology.* 34:2112-2124.

Csolle, C., A. Heinrich, A. Kittel, and B. Sperlagh. 2008. P2Y receptor mediated inhibitory modulation of noradrenaline release in response to electrical field stimulation and ischemic conditions in superfused rat hippocampus slices. *J Neurochem.* 106:347-360.

Cunha, R.A., and J.A. Ribeiro. 2000. ATP as a presynaptic modulator. *Life Sci.* 68:119-137.

Chao, D.L., L. Ma, and K. Shen. 2009. Transient cell-cell interactions in neural circuit formation. *Nat Rev Neurosci.* 10:262-271.

Chen, Z., S. Chen, L. Chen, J. Zhou, Q. Dai, L. Yang, X. Li, and L. Zhou. 2009. Long-term increasing co-localization of SCN8A and ankyrin-G in rat hippocampal cornu ammonis 1 after pilocarpine induced status epilepticus. *Brain Res.* 1270:112-120.

Cheung, K.K., W.Y. Chan, and G. Burnstock. 2005. Expression of P2X purinoceptors during rat brain development and their inhibitory role on motor axon outgrowth in neural tube explant cultures. *Neuroscience.* 133:937-945.

D'Ambrosi, N., P. Finocchi, S. Apolloni, M. Cozzolino, A. Ferri, V. Padovano, G. Pietrini, M.T. Carri, and C. Volonte. 2009. The proinflammatory action of microglial P2 receptors is enhanced in SOD1 models for amyotrophic lateral sclerosis. *J Immunol.* 183:4648-4656.

Da Silva, J.S., M. Medina, C. Zuliani, A. Di Nardo, W. Witke, and C.G. Dotti. 2003. RhoA/ROCK regulation of neuritogenesis via profilin IIa-mediated control of actin stability. *J Cell Biol.* 162:1267-1279.

Dani, J.A., and M.L. Mayer. 1995. Structure and function of glutamate and nicotinic acetylcholine receptors. *Curr Opin Neurobiol.* 5:310-317.

Davalos, D., J. Grutzendler, G. Yang, J.V. Kim, Y. Zuo, S. Jung, D.R. Littman, M.L. Dustin, and W.B. Gan. 2005. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci.* 8:752-758.

Debanne, D., S. Boudkazi, E. Campanac, R.H. Cudmore, P. Giraud, L. Fronzaroli-Molinieres, E. Carlier, and O. Caillard. 2008. Paired-recordings from synaptically coupled cortical and hippocampal neurons in acute and cultured brain slices. *Nat Protoc.* 3:1559-1568.

del Puerto, A., J.I. Diaz-Hernandez, M. Tapia, R. Gomez-Villafuertes, M.J. Benitez, J. Zhang, M.T. Miras-Portugal, F. Wandosell, M. Diaz-Hernandez, and J.J. Garrido. 2012. Adenylate cyclase 5 coordinates the action of ADP, P2Y1, P2Y13 and ATP-gated P2X7 receptors on axonal elongation. *J Cell Sci.* 125:176-188.

Delarasse, C., R. Auger, P. Gonnord, B. Fontaine, and J.M. Kanellopoulos. 2011. The purinergic receptor P2X7 triggers alpha-secretase-dependent processing of the amyloid precursor protein. *J Biol Chem.* 286:2596-2606.

Delcommenne, M., C. Tan, V. Gray, L. Rue, J. Woodgett, and S. Dedhar. 1998. Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:11211-11216.

Delic, J., and H. Zimmermann. 2010. Nucleotides affect neurogenesis and dopaminergic differentiation of mouse fetal midbrain-derived neural precursor cells. *Purinergic Signal.* 6:417-428.

Delicado, E.G., A.I. Jimenez, L.M. Carrasquero, E. Castro, and M.T. Miras-Portugal. 2005. Cross-talk among epidermal growth factor, Ap(5)A, and nucleotide receptors causing enhanced ATP Ca(2+) signaling involves extracellular kinase activation in cerebellar astrocytes. *J Neurosci Res.* 81:789-796.

Dent, E.W., S.L. Gupton, and F.B. Gertler. 2011. The growth cone cytoskeleton in axon outgrowth and guidance. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3.

Deuchars, S.A., L. Atkinson, R.E. Brooke, H. Musa, C.J. Milligan, T.F. Batten, N.J. Buckley, S.H. Parson, and J. Deuchars. 2001. Neuronal P2X7 receptors are targeted to presynaptic terminals in the central and

- peripheral nervous systems. *J Neurosci.* 21:7143-7152.
- Di Virgilio, F. 2003. Novel data point to a broader mechanism of action of oxidized ATP: the P2X7 receptor is not the only target. *Br J Pharmacol.* 140:441-443.
- Di Virgilio, F., P.A. Borea, and P. Illes. 2001. P2 receptors meet the immune system. *Trends Pharmacol Sci.* 22:5-7.
- Diaz-Hernandez, J.I., R. Gomez-Villafuertes, M. Leon-Otegui, L. Hontecillas-Prieto, A. Del Puerto, J.L. Trejo, J.J. Lucas, J.J. Garrido, J. Gualix, M.T. Miras-Portugal, and M. Diaz-Hernandez. 2012. In vivo P2X7 inhibition reduces amyloid plaques in Alzheimer's disease through GSK3beta and secretases. *Neurobiol Aging.* 33:1816-1828.
- Diaz-Hernandez, M., del Puerto, A.\*, J.I. Diaz-Hernandez, M. Diez-Zaera, J.J. Lucas, J.J. Garrido, and M.T. Miras-Portugal. 2008. Inhibition of the ATP-gated P2X7 receptor promotes axonal growth and branching in cultured hippocampal neurons. *J Cell Sci.* 121:3717-3728.
- Diaz-Hernandez, M., M. Diez-Zaera, J. Sanchez-Nogueiro, R. Gomez-Villafuertes, J.M. Canals, J. Alberch, M.T. Miras-Portugal, and J.J. Lucas. 2009. Altered P2X7-receptor level and function in mouse models of Huntington's disease and therapeutic efficacy of antagonist administration. *FASEB J.* 23:1893-1906.
- Diaz-Hernandez, M., J. Pintor, E. Castro, and M.T. Miras-Portugal. 2002. Co-localisation of functional nicotinic and ionotropic nucleotide receptors in isolated cholinergic synaptic terminals. *Neuropharmacology.* 42:20-33.
- Diez-Zaera, M., J.I. Diaz-Hernandez, E. Hernandez-Alvarez, H. Zimmermann, M. Diaz-Hernandez, and M.T. Miras-Portugal. 2011. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase promotes axonal growth of hippocampal neurons. *Mol Biol Cell.* 22:1014-1024.
- DiPilato, L.M., and J. Zhang. 2009. The role of membrane microdomains in shaping beta2-adrenergic receptor-mediated cAMP dynamics. *Mol Biosyst.* 5:832-837.
- Dotti, C.G., C.A. Sullivan, and G.A. Banker. 1988. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci.* 8:1454-1468.
- Duan, S., C.M. Anderson, E.C. Keung, Y. Chen, and R.A. Swanson. 2003. P2X7 receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes. *J Neurosci.* 23:1320-1328.
- Edwards, F.A., A.J. Gibb, and D. Colquhoun. 1992. ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system. *Nature.* 359:144-147.
- Edwards, R.H. 1992. The transport of neurotransmitters into synaptic vesicles. *Curr Opin Neurobiol.* 2:586-594.
- Egan, T.M., and B.S. Khakh. 2004. Contribution of calcium ions to P2X channel responses. *J Neurosci.* 24:3413-3420.
- Egan, T.M., D.S. Samways, and Z. Li. 2006. Biophysics of P2X receptors. *Pflugers Arch.* 452:501-512.
- Engel, T., R. Gomez-Villafuertes, K. Tanaka, G. Mesuret, A. Sanz-Rodriguez, P. Garcia-Huerta, M.T. Miras-Portugal, D.C. Henshall, and M. Diaz-Hernandez. 2012. Seizure suppression and neuroprotection by targeting the purinergic P2X7 receptor during status epilepticus in mice. *FASEB J.* 26:1616-1628.
- Ennion, S.J., and R.J. Evans. 2002. Conserved cysteine residues in the extracellular loop of the human P2X(1) receptor form disulfide bonds and are involved in receptor trafficking to the cell surface. *Mol Pharmacol.* 61:303-311.
- Erb, L., Z. Liao, C.I. Seye, and G.A. Weisman. 2006. P2 receptors: intracellular signaling. *Pflugers Arch.* 452:552-562.
- Esch, T., V. Lemmon, and G. Banker. 1999. Local presentation of substrate molecules directs axon specification by cultured hippocampal neurons. *J Neurosci.* 19:6417-6426.
- Espada, S., F. Ortega, E. Molina-Jijon, A.I. Rojo, R. Perez-Sen, J. Pedraza-Chaverri, M.T. Miras-Portugal, and A. Cuadrado. 2010. The purinergic P2Y(13) receptor activates the Nrf2/HO-1 axis and protects against oxidative stress-induced neuronal death. *Free Radic Biol Med.* 49:416-426.



- Evans, M.D., R.P. Sammons, S. Lebron, A.S. Dumitrescu, T.B. Watkins, V.N. Uebele, J.J. Renger, and M.S. Grubb. 2013. Calcineurin signaling mediates activity-dependent relocation of the axon initial segment. *J Neurosci.* 33:6950-6963.
- Evans, R.J., V. Derkach, and A. Surprenant. 1992. ATP mediates fast synaptic transmission in mammalian neurons. *Nature.* 357:503-505.
- Fam, S.R., C.J. Gallagher, L.V. Kalia, and M.W. Salter. 2003. Differential frequency dependence of P2Y1- and P2Y2- mediated Ca<sup>2+</sup> signaling in astrocytes. *J Neurosci.* 23:4437-4444.
- Ferreira, A., R. Kincaid, and K.S. Kosik. 1993. Calcineurin is associated with the cytoskeleton of cultured neurons and has a role in the acquisition of polarity. *Mol Biol Cell.* 4:1225-1238.
- Ferreira, M.A., M.C. O'Donovan, Y.A. Meng, I.R. Jones, D.M. Ruderfer, L. Jones, J. Fan, G. Kirov, R.H. Perlis, E.K. Green, J.W. Smoller, D. Grozeva, J. Stone, I. Nikolov, K. Chambert, M.L. Hamshire, V.L. Nimgaonkar, V. Moskvina, M.E. Thase, S. Caesar, G.S. Sachs, J. Franklin, K. Gordon-Smith, K.G. Ardlie, S.B. Gabriel, C. Fraser, B. Blumenstiel, M. Defelice, G. Breen, M. Gill, D.W. Morris, A. Elkin, W.J. Muir, K.A. McGhee, R. Williamson, D.J. MacIntyre, A.W. MacLean, C.D. St, M. Robinson, M. Van Beck, A.C. Pereira, R. Kandaswamy, A. McQuillin, D.A. Collier, N.J. Bass, A.H. Young, J. Lawrence, I.N. Ferrier, A. Anjorin, A. Farmer, D. Curtis, E.M. Scolnick, P. McGuffin, M.J. Daly, A.P. Corvin, P.A. Holmans, D.H. Blackwood, H.M. Gurling, M.J. Owen, S.M. Purcell, P. Sklar, and N. Craddock. 2008. Collaborative genome-wide association analysis supports a role for ANK3 and CACNA1C in bipolar disorder. *Nat Genet.* 40:1056-1058.
- Fields, R.D., and G. Burnstock. 2006. Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nat Rev Neurosci.* 7:423-436.
- Fields, R.D., and B. Stevens. 2000. ATP: an extracellular signaling molecule between neurons and glia. *Trends Neurosci.* 23:625-633.
- Filippov, A.K., T.E. Webb, E.A. Barnard, and D.A. Brown. 1998. P2Y2 nucleotide receptors expressed heterologously in sympathetic neurons inhibit both N-type Ca<sup>2+</sup> and M-type K<sup>+</sup> currents. *J Neurosci.* 18:5170-5179.
- Franke, H., B. Grummich, W. Hartig, J. Grosche, R. Regenthal, R.H. Edwards, P. Illes, and U. Krugel. 2006a. Changes in purinergic signaling after cerebral injury -- involvement of glutamatergic mechanisms? *Int J Dev Neurosci.* 24:123-132.
- Franke, H., A. Gunther, J. Grosche, R. Schmidt, S. Rossner, R. Reinhardt, H. Faber-Zuschratter, D. Schneider, and P. Illes. 2004. P2X7 receptor expression after ischemia in the cerebral cortex of rats. *J Neuropathol Exp Neurol.* 63:686-699.
- Franke, H., U. Krugel, and P. Illes. 2006b. P2 receptors and neuronal injury. *Pflugers Arch.* 452:622-644.
- Fujii, S., H. Sasaki, K. Mikoshiba, Y. Kuroda, Y. Yamazaki, A. Mostafa Taufiq, and H. Kato. 2004. A chemical LTP induced by co-activation of metabotropic and N-methyl-D-aspartate glutamate receptors in hippocampal CA1 neurons. *Brain Res.* 999:20-28.
- Fukata, Y., T. Kimura, and K. Kaibuchi. 2002. Axon specification in hippocampal neurons. *Neurosci Res.* 43:305-315.
- Fumagalli, M., R. Brambilla, N. D'Ambrosi, C. Volonte, M. Matteoli, C. Verderio, and M.P. Abbracchio. 2003. Nucleotide-mediated calcium signaling in rat cortical astrocytes: Role of P2X and P2Y receptors. *Glia.* 43:218-203.
- Gandelman, M., H. Peluffo, J.S. Beckman, P. Cassina, and L. Barbeito. 2010. Extracellular ATP and the P2X7 receptor in astrocyte-mediated motor neuron death: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroinflammation.* 7:33.
- Garcia-Hoz, C., G. Sanchez-Fernandez, M.T. Diaz-Meco, J. Moscat, F. Mayor, and C. Ribas. 2010. G alpha(q) acts as an adaptor protein in protein kinase C zeta (PKCzeta)-mediated ERK5 activation by G protein-coupled receptors (GPCR). *J Biol Chem.* 285:13480-13489.
- Garrido, J.J., P. Giraud, E. Carlier, F. Fernandes, A. Moussif, M.P. Fache, D. Debanne, and B. Dargent. 2003. A targeting motif involved in sodium channel clustering at the axonal initial segment. *Science.* 300:2091-

- Garrido, J.J., D. Simon, O. Varea, and F. Wandosell. 2007. GSK3 alpha and GSK3 beta are necessary for axon formation. *FEBS Lett.* 581:1579-1586.
- Garvalov, B.K., K.C. Flynn, D. Neukirchen, L. Meyn, N. Teusch, X. Wu, C. Brakebusch, J.R. Bamburg, and F. Bradke. 2007. Cdc42 regulates cofilin during the establishment of neuronal polarity. *J Neurosci.* 27:13117-13129.
- Gendron, F.P., M. Chalimoniuk, J. Strosznajder, S. Shen, F.A. Gonzalez, G.A. Weisman, and G.Y. Sun. 2003. P2X7 nucleotide receptor activation enhances IFN gamma-induced type II nitric oxide synthase activity in BV-2 microglial cells. *J Neurochem.* 87:344-352.
- Gever, J.R., D.A. Cockayne, M.P. Dillon, G. Burnstock, and A.P. Ford. 2006. Pharmacology of P2X channels. *Pflugers Arch.* 452:513-537.
- Ghosh-Roy, A., Z. Wu, A. Goncharov, Y. Jin, and A.D. Chisholm. 2010. Calcium and cyclic AMP promote axonal regeneration in *Caenorhabditis elegans* and require DLK-1 kinase. *J Neurosci.* 30:3175-3183.
- Gomez-Villafuertes, R., J. Gualix, and M.T. Miras-Portugal. 2001. Single GABAergic synaptic terminals from rat midbrain exhibit functional P2X and dinucleotide receptors, able to induce GABA secretion. *J Neurochem.* 77:84-93.
- Gomez, T.M., and N.C. Spitzer. 1999. In vivo regulation of axon extension and pathfinding by growth-cone calcium transients. *Nature.* 397:350-355.
- Gomez, T.M., and J.Q. Zheng. 2006. The molecular basis for calcium-dependent axon pathfinding. *Nat Rev Neurosci.* 7:115-125.
- Goslin, K., and G. Banker. 1989. Experimental observations on the development of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Cell Biol.* 108:1507-1516.
- Govek, E.E., S.E. Newey, and L. Van Aelst. 2005. The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev.* 19:1-49.
- Greenwood, D., D.J. Jagger, L.C. Huang, N. Hoya, P.R. Thorne, S.S. Wildman, B.F. King, K. Pak, A.F. Ryan, and G.D. Housley. 2007. P2X receptor signaling inhibits BDNF-mediated spiral ganglion neuron development in the neonatal rat cochlea. *Development.* 134:1407-1417.
- Grimes, C.A., and R.S. Johe. 2001. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. *Prog Neurobiol.* 65:391-426.
- Grimm, I., N. Messemer, M. Stanke, C. Gachet, and H. Zimmermann. 2009. Coordinate pathways for nucleotide and EGF signaling in cultured adult neural progenitor cells. *J Cell Sci.* 122:2524-2533.
- Grubb, M.S., and J. Burrone. 2010. Activity-dependent relocation of the axon initial segment fine-tunes neuronal excitability. *Nature.* 465:1070-1074.
- Gualix, J., M. Abal, J. Pintor, F. Garcia-Carmona, and M.T. Miras-Portugal. 1996. Nucleotide vesicular transporter of bovine chromaffin granules. Evidence for a mnemonic regulation. *J Biol Chem.* 271:1957-1965.
- Gualix, J., R. Gomez-Villafuertes, M. Diaz-Hernandez, and M.T. Miras-Portugal. 2003. Presence of functional ATP and dinucleotide receptors in glutamatergic synaptic terminals from rat midbrain. *J Neurochem.* 87:160-171.
- Gualix, J., J. Pintor, and M.T. Miras-Portugal. 1999. Characterization of nucleotide transport into rat brain synaptic vesicles. *J Neurochem.* 73:1098-1104.
- Guillou, J.L., H. Nakata, and D.M. Cooper. 1999. Inhibition by calcium of mammalian adenylyl cyclases. *J Biol Chem.* 274:35539-35545.
- Guo, W., H. Jiang, V. Gray, S. Dedhar, and Y. Rao. 2007. Role of the integrin-linked kinase (ILK) in determining neuronal polarity. *Dev Biol.* 306:457-468.
- Hamilton, N., S. Vayro, F. Kirchhoff, A. Verkhratsky, J. Robbins, D.C. Gorecki, and A.M. Butt. 2008. Mechanisms of ATP- and glutamate-mediated calcium signaling in white matter astrocytes. *Glia.* 56:734-749.
- Hanisch, U.K. 2002. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia.* 40:140-155.



- Hannigan, G., A.A. Troussard, and S. Dedhar. 2005. Integrin-linked kinase: a cancer therapeutic target unique among its ILK. *Nat Rev Cancer*. 5:51-63.
- Hassenklover, T., P. Schwartz, D. Schild, and I. Manzini. 2009. Purinergic signaling regulates cell proliferation of olfactory epithelium progenitors. *Stem Cells*. 27:2022-2031.
- Haynes, S.E., G. Hollopeter, G. Yang, D. Kurpius, M.E. Dailey, W.B. Gan, and D. Julius. 2006. The P2Y<sub>12</sub> receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nat Neurosci*. 9:1512-1519.
- Hedstrom, K.L., Y. Ogawa, and M.N. Rasband. 2008. AnkyrinG is required for maintenance of the axon initial segment and neuronal polarity. *J Cell Biol*. 183:635-640.
- Hedstrom, K.L., X. Xu, Y. Ogawa, R. Frischknecht, C.I. Seidenbecher, P. Shrager, and M.N. Rasband. 2007. Neurofascin assembles a specialized extracellular matrix at the axon initial segment. *J Cell Biol*. 178:875-886.
- Heine, C., B. Heimrich, J. Vogt, A. Wegner, P. Illes, and H. Franke. 2006. P2 receptor-stimulation influences axonal outgrowth in the developing hippocampus in vitro. *Neuroscience*. 138:303-311.
- Heinrich, A., A. Kittel, C. Csolle, E. Sylvester Vizi, and B. Sperlagh. 2008. Modulation of neurotransmitter release by P2X and P2Y receptors in the rat spinal cord. *Neuropharmacology*. 54:375-386.
- Henley, J., and M.M. Poo. 2004. Guiding neuronal growth cones using Ca<sup>2+</sup> signals. *Trends Cell Biol*. 14:320-330.
- Heo, J.S., and H.J. Han. 2006. ATP stimulates mouse embryonic stem cell proliferation via protein kinase C, phosphatidylinositol 3-kinase/Akt, and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Stem Cells*. 24:2637-2648.
- Hervas, C., R. Perez-Sen, and M.T. Miras-Portugal. 2003. Coexpression of functional P2X and P2Y nucleotide receptors in single cerebellar granule cells. *J Neurosci Res*. 73:384-399.
- Hibell, A.D., E.J. Kidd, I.P. Chessell, P.P. Humphrey, and A.D. Michel. 2000. Apparent species differences in the kinetic properties of P2X<sub>7</sub> receptors. *Br J Pharmacol*. 130:167-173.
- Hibell, A.D., K.M. Thompson, J. Simon, M. Xing, P.P. Humphrey, and A.D. Michel. 2001. Species- and agonist-dependent differences in the deactivation-kinetics of P2X<sub>7</sub> receptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 363:639-648.
- Hilliard, M.A., and C.I. Bargmann. 2006. Wnt signals and frizzled activity orient anterior-posterior axon outgrowth in *C. elegans*. *Dev Cell*. 10:379-390.
- Hirokawa, N., S. Niwa, and Y. Tanaka. 2010. Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. *Neuron*. 68:610-638.
- Hoffmann, C., S. Moro, R.A. Nicholas, T.K. Harden, and K.A. Jacobson. 1999. The role of amino acids in extracellular loops of the human P2Y<sub>1</sub> receptor in surface expression and activation processes. *J Biol Chem*. 274:14639-14647.
- Hollopeter, G., H.M. Jantzen, D. Vincent, G. Li, L. England, V. Ramakrishnan, R.B. Yang, P. Nurden, A. Nurden, D. Julius, and P.B. Conley. 2001. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature*. 409:202-207.
- Homma, K., Y. Niino, K. Hotta, and K. Oka. 2008. Ca<sup>2+</sup> influx through P2X receptors induces actin cytoskeleton reorganization by the formation of cofilin rods in neurites. *Mol Cell Neurosci*. 37:261-270.
- Howard, J., and A.A. Hyman. 2003. Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature*. 422:753-758.
- Hu, B., H. Nakata, C. Gu, T. De Beer, and D.M. Cooper. 2002. A critical interplay between Ca<sup>2+</sup> inhibition and activation by Mg<sup>2+</sup> of AC5 revealed by mutants and chimeric constructs. *J Biol Chem*. 277:33139-33147.
- Huang, E.J., and L.F. Reichardt. 2003. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem*. 72:609-642.
- Hugel, S., and R. Schlichter. 2000. Presynaptic P2X receptors facilitate inhibitory GABAergic transmission

- between cultured rat spinal cord dorsal horn neurons. *J Neurosci.* 20:2121-2130.
- Humphreys, B.D., C. Virginio, A. Surprenant, J. Rice, and G.R. Dubyak. 1998. Isoquinolines as antagonists of the P2X7 nucleotide receptor: high selectivity for the human versus rat receptor homologues. *Mol Pharmacol.* 54:22-32.
- Hutchins, B.I., and K. Kalil. 2008. Differential outgrowth of axons and their branches is regulated by localized calcium transients. *J Neurosci.* 28:143-153.
- Ikeuchi, Y., and T. Nishizaki. 1995. ATP-evoked potassium currents in rat striatal neurons are mediated by a P2 purinergic receptor. *Neurosci Lett.* 190:89-92.
- Innocenti, B., V. Parpura, and P.G. Haydon. 2000. Imaging extracellular waves of glutamate during calcium signaling in cultured astrocytes. *J Neurosci.* 20:1800-1808.
- Inoki, K., H. Ouyang, T. Zhu, C. Lindvall, Y. Wang, X. Zhang, Q. Yang, C. Bennett, Y. Harada, K. Stankunas, C.Y. Wang, X. He, O.A. MacDougald, M. You, B.O. Williams, and K.L. Guan. 2006. TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell.* 126:955-968.
- Inoue, K. 1998. ATP receptors for the protection of hippocampal functions. *Jpn J Pharmacol.* 78:405-410.
- Iona, S., M. Cuomo, T. Bushnik, F. Naro, C. Sette, M. Hess, E.R. Shelton, and M. Conti. 1998. Characterization of the rolipram-sensitive, cyclic AMP-specific phosphodiesterases: identification and differential expression of immunologically distinct forms in the rat brain. *Mol Pharmacol.* 53:23-32.
- Itofusa, R., and H. Kamiguchi. 2011. Polarizing membrane dynamics and adhesion for growth cone navigation. *Mol Cell Neurosci.* 48:332-338.
- Jahr, C.E., and T.M. Jessell. 1983. ATP excites a subpopulation of rat dorsal horn neurones. *Nature.* 304:730-733.
- Jarvis, M.F., and B.S. Khakh. 2009. ATP-gated P2X cation-channels. *Neuropharmacology.* 56:208-215.
- Jenkins, S.M., and V. Bennett. 2001. Ankyrin-G coordinates assembly of the spectrin-based membrane skeleton, voltage-gated sodium channels, and L1 CAMs at Purkinje neuron initial segments. *J Cell Biol.* 155:739-746.
- Jiang, H., W. Guo, X. Liang, and Y. Rao. 2005. Both the establishment and the maintenance of neuronal polarity require active mechanisms: critical roles of GSK-3 $\beta$  and its upstream regulators. *Cell.* 120:123-135.
- Jiang, L.H., A.B. Mackenzie, R.A. North, and A. Surprenant. 2000. Brilliant blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X(7) receptors. *Mol Pharmacol.* 58:82-88.
- Jiang, Q., D. Guo, B.X. Lee, A.M. Van Rhee, Y.C. Kim, R.A. Nicholas, J.B. Schachter, T.K. Harden, and K.A. Jacobson. 1997. A mutational analysis of residues essential for ligand recognition at the human P2Y1 receptor. *Mol Pharmacol.* 52:499-507.
- Jo, S., and B.P. Bean. 2011. Inhibition of neuronal voltage-gated sodium channels by brilliant blue G. *Mol Pharmacol.* 80:247-257.
- Jo, Y.H., and L.W. Role. 2002. Coordinate release of ATP and GABA at in vitro synapses of lateral hypothalamic neurons. *J Neurosci.* 22:4794-4804.
- Johnston, J., S.J. Griffin, C. Baker, A. Skrzypiec, T. Chernova, and I.D. Forsythe. 2008. Initial segment Kv2.2 channels mediate a slow delayed rectifier and maintain high frequency action potential firing in medial nucleus of the trapezoid body neurons. *J Physiol.* 586:3493-3509.
- Kaech, S., and G. Banker. 2006. Culturing hippocampal neurons. *Nat Protoc.* 1:2406-2415.
- Kampfl, A., R. Posmantur, R. Nixon, F. Grynspan, X. Zhao, S.J. Liu, J.K. Newcomb, G.L. Clifton, and R.L. Hayes. 1996.  $\mu$ -calpain activation and calpain-mediated cytoskeletal proteolysis following traumatic brain injury. *J Neurochem.* 67:1575-1583.
- Kang, J., L. Jiang, S.A. Goldman, and M. Nedergaard. 1998. Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat Neurosci.* 1:683-692.
- Kaphzan, H., S.A. Buffington, J.I. Jung, M.N. Rasband, and E. Klann. 2011. Alterations in intrinsic membrane

properties and the axon initial segment in a mouse model of Angelman syndrome. *J Neurosci.* 31:17637-17648.

- Kapoor, J.R., and C.D. Sladek. 2000. Purinergic and adrenergic agonists synergize in stimulating vasopressin and oxytocin release. *J Neurosci.* 20:8868-8875.
- Kawabe, J., G. Iwami, T. Ebina, S. Ohno, T. Katada, Y. Ueda, C.J. Homcy, and Y. Ishikawa. 1994. Differential activation of adenylyl cyclase by protein kinase C isoenzymes. *J Biol Chem.* 269:16554-16558.
- Keith, C., M. DiPaola, F.R. Maxfield, and M.L. Shelanski. 1983. Microinjection of  $Ca^{++}$ -calmodulin causes a localized depolymerization of microtubules. *J Cell Biol.* 97:1918-1924.
- Khaira, S.K., C.W. Pouton, and J.M. Haynes. 2009. P2X2, P2X4 and P2Y1 receptors elevate intracellular  $Ca^{2+}$  in mouse embryonic stem cell-derived GABAergic neurons. *Br J Pharmacol.* 158:1922-1931.
- Khakh, B.S., D. Gittermann, D.A. Cockayne, and A. Jones. 2003. ATP modulation of excitatory synapses onto interneurons. *J Neurosci.* 23:7426-7437.
- Kheirbek, M.A., J.A. Beeler, W. Chi, Y. Ishikawa, and X. Zhuang. 2010. A molecular dissociation between cued and contextual appetitive learning. *Learn Mem.* 17:148-154.
- Kheirbek, M.A., J.P. Britt, J.A. Beeler, Y. Ishikawa, D.S. McGehee, and X. Zhuang. 2009. Adenylyl cyclase type 5 contributes to corticostriatal plasticity and striatum-dependent learning. *J Neurosci.* 29:12115-12124.
- Kim, K.S., J. Kim, S.K. Back, J.Y. Im, H.S. Na, and P.L. Han. 2007. Markedly attenuated acute and chronic pain responses in mice lacking adenylyl cyclase-5. *Genes Brain Behav.* 6:120-127.
- Kim, K.S., K.W. Lee, I.S. Baek, C.M. Lim, V. Krishnan, J.K. Lee, E.J. Nestler, and P.L. Han. 2008. Adenylyl cyclase-5 activity in the nucleus accumbens regulates anxiety-related behavior. *J Neurochem.* 107:105-115.
- Kim, M., L.H. Jiang, H.L. Wilson, R.A. North, and A. Surprenant. 2001. Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex. *EMBO J.* 20:6347-6358.
- Kim, Y.C., J.S. Lee, K. Sak, F. Marteau, L. Mamedova, J.M. Boeynaems, and K.A. Jacobson. 2005. Synthesis of pyridoxal phosphate derivatives with antagonist activity at the P2Y13 receptor. *Biochem Pharmacol.* 70:266-274.
- Kimbler, D.E., J. Shields, N. Yanasak, J.R. Vender, and K.M. Dhandapani. 2012. Activation of P2X7 promotes cerebral edema and neurological injury after traumatic brain injury in mice. *PLoS One.* 7:e41229.
- King, B.F., M. Liu, J. Pintor, J. Gualix, M.T. Miras-Portugal, and G. Burnstock. 1999. Diinosine pentaphosphate (IP5I) is a potent antagonist at recombinant rat P2X1 receptors. *Br J Pharmacol.* 128:981-988.
- Kirischuk, S., T. Moller, N. Voitenko, H. Kettenmann, and A. Verkhratsky. 1995. ATP-induced cytoplasmic calcium mobilization in Bergmann glial cells. *J Neurosci.* 15:7861-7871.
- Kolb, H.A., and M.J. Wakelam. 1983. Transmitter-like action of ATP on patched membranes of cultured myoblasts and myotubes. *Nature.* 303:621-623.
- Kole, M.H., S.U. Ilschner, B.M. Kampa, S.R. Williams, P.C. Ruben, and G.J. Stuart. 2008. Action potential generation requires a high sodium channel density in the axon initial segment. *Nat Neurosci.* 11:178-186.
- Kole, M.H., J.J. Letzkus, and G.J. Stuart. 2007. Axon initial segment Kv1 channels control axonal action potential waveform and synaptic efficacy. *Neuron.* 55:633-647.
- Kreutzberg, G.W. 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* 19:312-318.
- Krishnan, V., A. Graham, M.S. Mazei-Robison, D.C. Lagace, K.S. Kim, S. Birnbaum, A.J. Eisch, P.L. Han, D.R. Storm, V. Zachariou, and E.J. Nestler. 2008. Calcium-sensitive adenylyl cyclases in depression and anxiety: behavioral and biochemical consequences of isoform targeting. *Biol Psychiatry.* 64:336-343.
- Krishtal, O.A., S.M. Marchenko, and V.I. Pidoplichko. 1983. Receptor for ATP in the membrane of mammalian sensory neurones. *Neurosci Lett.* 35:41-45.
- Krugel, U., H. Kittner, H. Franke, and P. Illes. 2003. Purinergic modulation of neuronal activity in the mesolimbic dopaminergic system in vivo. *Synapse.* 47:134-142.

- Kuba, H., Y. Oichi, and H. Ohmori. 2010. Presynaptic activity regulates Na(+) channel distribution at the axon initial segment. *Nature*. 465:1075-1078.
- Kukley, M., P. Stausberg, G. Adelman, I.P. Chessell, and D. Dietrich. 2004. Ecto-nucleotidases and nucleoside transporters mediate activation of adenosine receptors on hippocampal mossy fibers by P2X7 receptor agonist 2'-3'-O-(4-benzoylbenzoyl)-ATP. *J Neurosci*. 24:7128-7139.
- Kunapuli, S.P., and J.L. Daniel. 1998. P2 receptor subtypes in the cardiovascular system. *Biochem J*. 336 ( Pt 3):513-523.
- Laemmli, U.K., F. Beguin, and G. Gujer-Kellenberger. 1970. A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *J Mol Biol*. 47:69-85.
- Lagerstrom, M.C., and H.B. Schioth. 2008. Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 7:339-357.
- Lammer, A., A. Gunther, A. Beck, U. Krugel, H. Kittner, D. Schneider, P. Illes, and H. Franke. 2006. Neuroprotective effects of the P2 receptor antagonist PPADS on focal cerebral ischaemia-induced injury in rats. *Eur J Neurosci*. 23:2824-2828.
- Le, K.T., P. Villeneuve, A.R. Ramjaun, P.S. McPherson, A. Beaudet, and P. Seguela. 1998. Sensory presynaptic and widespread somatodendritic immunolocalization of central ionotropic P2X ATP receptors. *Neuroscience*. 83:177-190.
- Leon-Otegui, M., R. Gomez-Villafuertes, J.I. Diaz-Hernandez, M. Diaz-Hernandez, M.T. Miras-Portugal, and J. Gualix. 2011. Opposite effects of P2X7 and P2Y2 nucleotide receptors on alpha-secretase-dependent APP processing in Neuro-2a cells. *FEBS Lett*. 585:2255-2262.
- Leon, D., C. Hervas, and M.T. Miras-Portugal. 2006. P2Y1 and P2X7 receptors induce calcium/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation in cerebellar granule neurons. *Eur J Neurosci*. 23:2999-3013.
- Li, Y.H., H. Werner, and A.W. Puschel. 2008. Rheb and mTOR regulate neuronal polarity through Rap1B. *J Biol Chem*. 283:33784-33792.
- Liu, X., K. Hashimoto-Torii, M. Torii, T.F. Haydar, and P. Rakic. 2008. The role of ATP signaling in the migration of intermediate neuronal progenitors to the neocortical subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:11802-11807.
- Locovei, S., E. Scemes, F. Qiu, D.C. Spray, and G. Dahl. 2007. Pannexin1 is part of the pore forming unit of the P2X(7) receptor death complex. *FEBS Lett*. 581:483-488.
- Longa, E.Z., P.R. Weinstein, S. Carlson, and R. Cummins. 1989. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 20:84-91.
- Lowery, L.A., and D. Van Vactor. 2009. The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 10:332-343.
- Lu, P., H. Yang, L.L. Jones, M.T. Filbin, and M.H. Tuszynski. 2004. Combinatorial therapy with neurotrophins and cAMP promotes axonal regeneration beyond sites of spinal cord injury. *J Neurosci*. 24:6402-6409.
- Luthardt, J., S.J. Borvendeg, B. Sperlagh, W. Poelchen, K. Wirkner, and P. Illes. 2003. P2Y(1) receptor activation inhibits NMDA receptor-channels in layer V pyramidal neurons of the rat prefrontal and parietal cortex. *Neurochem Int*. 42:161-172.
- Majumder, P., C.A. Trujillo, C.G. Lopes, R.R. Resende, K.N. Gomes, K.K. Yuahasi, L.R. Britto, and H. Ulrich. 2007. New insights into purinergic receptor signaling in neuronal differentiation, neuroprotection, and brain disorders. *Purinergic Signal*. 3:317-331.
- Malin, S.A., and D.C. Molliver. 2010. Gi- and Gq-coupled ADP (P2Y) receptors act in opposition to modulate nociceptive signaling and inflammatory pain behavior. *Mol Pain*. 6:21.
- Marteau, F., E. Le Poul, D. Communi, C. Labouret, P. Savi, J.M. Boeynaems, and N.S. Gonzalez. 2003. Pharmacological characterization of the human P2Y13 receptor. *Mol Pharmacol*. 64:104-112.
- Mateo, J., M.T. Miras-Portugal, and E. Castro. 1996. Co-existence of P2Y-and PPADS-insensitive P2U-purinoreceptors in endothelial cells from adrenal medulla. *Br J Pharmacol*. 119:1223-1232.

- Matsuoka, I., Y. Suzuki, N. Defer, H. Nakanishi, and J. Hanoune. 1997. Differential expression of type I, II, and V adenylyl cyclase gene in the postnatal developing rat brain. *J Neurochem.* 68:498-506.
- Mattson, M.P., and S.B. Kater. 1987. Calcium regulation of neurite elongation and growth cone motility. *J Neurosci.* 7:4034-4043.
- Mattson, M.P., M. Murain, and P.B. Guthrie. 1990. Localized calcium influx orients axon formation in embryonic hippocampal pyramidal neurons. *Brain Res Dev Brain Res.* 52:201-209.
- McGaraughty, S., K.L. Chu, M.T. Namovic, D.L. Donnelly-Roberts, R.R. Harris, X.F. Zhang, C.C. Shieh, C.T. Wismer, C.Z. Zhu, D.M. Gauvin, A.C. Fabiyi, P. Honore, R.J. Gregg, M.E. Kort, D.W. Nelson, W.A. Carroll, K. Marsh, C.R. Faltynek, and M.F. Jarvis. 2007. P2X7-related modulation of pathological nociception in rats. *Neuroscience.* 146:1817-1828.
- McLarnon, J.G. 2005. Purinergic mediated changes in Ca<sup>2+</sup> mobilization and functional responses in microglia: effects of low levels of ATP. *J Neurosci Res.* 81:349-356.
- McLarnon, J.G., J.K. Ryu, D.G. Walker, and H.B. Choi. 2006. Upregulated expression of purinergic P2X(7) receptor in Alzheimer disease and amyloid-beta peptide-treated microglia and in peptide-injected rat hippocampus. *J Neuropathol Exp Neurol.* 65:1090-1097.
- Melani, A., S. Amadio, M. Gianfriddo, M.G. Vannucchi, C. Volonte, G. Bernardi, F. Pedata, and G. Sancesario. 2006. P2X7 receptor modulation on microglial cells and reduction of brain infarct caused by middle cerebral artery occlusion in rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 26:974-982.
- Melani, A., F. Corti, H. Stephan, C.E. Muller, C. Donati, P. Bruni, M.G. Vannucchi, and F. Pedata. 2012. Ecto-ATPase inhibition: ATP and adenosine release under physiological and ischemic in vivo conditions in the rat striatum. *Exp Neurol.* 233:193-204.
- Melani, A., D. Turchi, M.G. Vannucchi, S. Cipriani, M. Gianfriddo, and F. Pedata. 2005. ATP extracellular concentrations are increased in the rat striatum during in vivo ischemia. *Neurochem Int.* 47:442-448.
- Menager, C., N. Arimura, Y. Fukata, and K. Kaibuchi. 2004. PIP3 is involved in neuronal polarization and axon formation. *J Neurochem.* 89:109-118.
- Mendoza-Fernandez, V., R.D. Andrew, and C. Barajas-Lopez. 2000. ATP inhibits glutamate synaptic release by acting at P2Y receptors in pyramidal neurons of hippocampal slices. *J Pharmacol Exp Ther.* 293:172-179.
- Milius, D., B. Sperlagh, and P. Illes. 2008. Up-regulation of P2X7 receptor-immunoreactivity by in vitro ischemia on the plasma membrane of cultured rat cortical neurons. *Neurosci Lett.* 446:45-50.
- Miras-Portugal, M.T., M. Diaz-Hernandez, L. Giraldez, C. Hervas, R. Gomez-Villafuertes, R.P. Sen, J. Gualix, and J. Pintor. 2003. P2X7 receptors in rat brain: presence in synaptic terminals and granule cells. *Neurochem Res.* 28:1597-1605.
- Mishra, S.K., N. Braun, V. Shukla, M. Fullgrabe, C. Schomerus, H.W. Korf, C. Gachet, Y. Ikehara, J. Seigny, S.C. Robson, and H. Zimmermann. 2006. Extracellular nucleotide signaling in adult neural stem cells: synergism with growth factor-mediated cellular proliferation. *Development.* 133:675-684.
- Mizuhashi, S., N. Nishiyama, N. Matsuki, and Y. Ikegaya. 2001. Cyclic nucleotide-mediated regulation of hippocampal mossy fiber development: a target-specific guidance. *J Neurosci.* 21:6181-6194.
- Moller, T., O. Kann, A. Verkhratsky, and H. Kettenmann. 2000. Activation of mouse microglial cells affects P2 receptor signaling. *Brain Res.* 853:49-59.
- Moore, D., J. Chambers, H. Waldvogel, R. Faull, and P. Emson. 2000a. Regional and cellular distribution of the P2Y(1) purinergic receptor in the human brain: striking neuronal localisation. *J Comp Neurol.* 421:374-384.
- Moore, D., S. Iritani, J. Chambers, and P. Emson. 2000b. Immunohistochemical localization of the P2Y1 purinergic receptor in Alzheimer's disease. *Neuroreport.* 11:3799-3803.
- Mori, M., C. Heuss, B.H. Gähwiler, and U. Gerber. 2001. Fast synaptic transmission mediated by P2X receptors in CA3 pyramidal cells of rat hippocampal slice cultures. *J Physiol.* 535:115-123.
- Moro, S., D. Guo, E. Camaioni, J.L. Boyer, T.K. Harden, and K.A. Jacobson. 1998. Human P2Y1 receptor: molecular



- modeling and site-directed mutagenesis as tools to identify agonist and antagonist recognition sites. *J Med Chem.* 41:1456-1466.
- Mukai, F., K. Ishiguro, Y. Sano, and S.C. Fujita. 2002. Alternative splicing isoform of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3 $\beta$ . *J Neurochem.* 81:1073-1083.
- Murgia, M., S. Hanau, P. Pizzo, M. Rippa, and F. Di Virgilio. 1993. Oxidized ATP. An irreversible inhibitor of the macrophage purinergic P2Z receptor. *J Biol Chem.* 268:8199-8203.
- Myers, J.P., M. Santiago-Medina, and T.M. Gomez. 2011. Regulation of axonal outgrowth and pathfinding by integrin-ECM interactions. *Dev Neurobiol.* 71:901-923.
- Nakada, C., K. Ritchie, Y. Oba, M. Nakamura, Y. Hotta, R. Iino, R.S. Kasai, K. Yamaguchi, T. Fujiwara, and A. Kusumi. 2003. Accumulation of anchored proteins forms membrane diffusion barriers during neuronal polarization. *Nat Cell Biol.* 5:626-632.
- Nakamura, F., and S.M. Strittmatter. 1996. P2Y1 purinergic receptors in sensory neurons: contribution to touch-induced impulse generation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:10465-10470.
- Neary, J.T., and Y. Kang. 2006. P2 purinergic receptors signal to glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in astrocytes. *J Neurosci Res.* 84:515-524.
- Neary, J.T., Y. Kang, Y.F. Shi, M.D. Tran, and I.B. Wanner. 2006. P2 receptor signalling, proliferation of astrocytes, and expression of molecules involved in cell-cell interactions. *Novartis Found Symp.* 276:131-143; discussion 143-137, 233-137, 275-181.
- Neukirchen, D., and F. Bradke. 2011. Neuronal polarization and the cytoskeleton. *Semin Cell Dev Biol.* 22:825-833.
- Newman, E.A. 2003. New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission. *Trends Neurosci.* 26:536-542.
- Nicke, A., H.G. Baumert, J. Rettinger, A. Eichele, G. Lambrecht, E. Mutschler, and G. Schmalzing. 1998. P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *EMBO J.* 17:3016-3028.
- Nieber, K., W. Poelchen, and P. Illes. 1997. Role of ATP in fast excitatory synaptic potentials in locus coeruleus neurones of the rat. *Br J Pharmacol.* 122:423-430.
- Nikulina, E., J.L. Tidwell, H.N. Dai, B.S. Bregman, and M.T. Filbin. 2004. The phosphodiesterase inhibitor rolipram delivered after a spinal cord lesion promotes axonal regeneration and functional recovery. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:8786-8790.
- Nishida, K., T. Nakatani, A. Ohishi, H. Okuda, Y. Higashi, T. Matsuo, S. Fujimoto, and K. Nagasawa. 2012. Mitochondrial dysfunction is involved in P2X7 receptor-mediated neuronal cell death. *J Neurochem.* 122:1118-1128.
- Nishimura, K., H. Akiyama, M. Komada, and H. Kamiguchi. 2007.  $\beta$ IV-spectrin forms a diffusion barrier against L1CAM at the axon initial segment. *Mol Cell Neurosci.* 34:422-430.
- Nishimura, T., K. Kato, T. Yamaguchi, Y. Fukata, S. Ohno, and K. Kaibuchi. 2004. Role of the PAR-3-KIF3 complex in the establishment of neuronal polarity. *Nat Cell Biol.* 6:328-334.
- Nishimura, T., T. Yamaguchi, K. Kato, M. Yoshizawa, Y. Nabeshima, S. Ohno, M. Hoshino, and K. Kaibuchi. 2005. PAR-6-PAR-3 mediates Cdc42-induced Rac activation through the Rac GEFs STEF/Tiam1. *Nat Cell Biol.* 7:270-277.
- Noctor, S.C., A.C. Flint, T.A. Weissman, R.S. Dammerman, and A.R. Kriegstein. 2001. Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature.* 409:714-720.
- Noctor, S.C., A.C. Flint, T.A. Weissman, W.S. Wong, B.K. Clinton, and A.R. Kriegstein. 2002. Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. *J Neurosci.* 22:3161-3173.
- North, R.A. 2002. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev.* 82:1013-1067.
- Nunes, P.H., C. Calaza Kda, L.M. Albuquerque, L. Frangel-Madeira, A. Sholl-Franco, and A.L. Ventura. 2007.

Signal transduction pathways associated with ATP-induced proliferation of cell progenitors in the intact embryonic retina. *Int J Dev Neurosci.* 25:499-508.

- O'Donnell, M., R.K. Chance, and G.J. Bashaw. 2009. Axon growth and guidance: receptor regulation and signal transduction. *Annu Rev Neurosci.* 32:383-412.
- Ogawa, Y., I. Horresh, J.S. Trimmer, D.S. Bredt, E. Peles, and M.N. Rasband. 2008. Postsynaptic density-93 clusters Kv1 channels at axon initial segments independently of Caspr2. *J Neurosci.* 28:5731-5739.
- Ogawa, Y., and M.N. Rasband. 2008. The functional organization and assembly of the axon initial segment. *Curr Opin Neurobiol.* 18:307-313.
- Ohno, S. 2001. Intercellular junctions and cellular polarity: the PAR-aPKC complex, a conserved core cassette playing fundamental roles in cell polarity. *Curr Opin Cell Biol.* 13:641-648.
- Ohsawa, K., Y. Irino, Y. Nakamura, C. Akazawa, K. Inoue, and S. Kohsaka. 2007. Involvement of P2X4 and P2Y12 receptors in ATP-induced microglial chemotaxis. *Glia.* 55:604-616.
- Oinuma, I., H. Katoh, and M. Negishi. 2007. R-Ras controls axon specification upstream of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  through integrin-linked kinase. *J Biol Chem.* 282:303-318.
- Onda, T., Y. Hashimoto, M. Nagai, H. Kuramochi, S. Saito, H. Yamazaki, Y. Toya, I. Sakai, C.J. Homcy, K. Nishikawa, and Y. Ishikawa. 2001. Type-specific regulation of adenylyl cyclase. Selective pharmacological stimulation and inhibition of adenylyl cyclase isoforms. *J Biol Chem.* 276:47785-47793.
- Ortega, F., R. Perez-Sen, E.G. Delicado, and M. Teresa Miras-Portugal. 2011. ERK1/2 activation is involved in the neuroprotective action of P2Y13 and P2X7 receptors against glutamate excitotoxicity in cerebellar granule neurons. *Neuropharmacology.* 61:1210-1221.
- Oyanguren-Desez, O., A. Rodriguez-Antiguedad, P. Villoslada, M. Domercq, E. Alberdi, and C. Matute. 2011. Gain-of-function of P2X7 receptor gene variants in multiple sclerosis. *Cell Calcium.* 50:468-472.
- Palmer, R.K., J.L. Boyer, J.B. Schachter, R.A. Nicholas, and T.K. Harden. 1998. Agonist action of adenosine triphosphates at the human P2Y1 receptor. *Mol Pharmacol.* 54:1118-1123.
- Pan, Z., T. Kao, Z. Horvath, J. Lemos, J.Y. Sul, S.D. Cranstoun, V. Bennett, S.S. Scherer, and E.C. Cooper. 2006. A common ankyrin-G-based mechanism retains KCNQ and NaV channels at electrically active domains of the axon. *J Neurosci.* 26:2599-2613.
- Pankratov, Y., E. Castro, M.T. Miras-Portugal, and O. Krishtal. 1998. A purinergic component of the excitatory postsynaptic current mediated by P2X receptors in the CA1 neurons of the rat hippocampus. *Eur J Neurosci.* 10:3898-3902.
- Pankratov, Y., U. Lalo, O. Krishtal, and A. Verkhratsky. 2002. Ionotropic P2X purinoreceptors mediate synaptic transmission in rat pyramidal neurones of layer II/III of somato-sensory cortex. *J Physiol.* 542:529-536.
- Pankratov, Y., U. Lalo, O.A. Krishtal, and A. Verkhratsky. 2009. P2X receptors and synaptic plasticity. *Neuroscience.* 158:137-148.
- Pankratov, Y., U. Lalo, A. Verkhratsky, and R.A. North. 2006. Vesicular release of ATP at central synapses. *Pflugers Arch.* 452:589-597.
- Pannicke, T., W. Fischer, B. Biedermann, H. Schadlich, J. Grosche, F. Faude, P. Wiedemann, C. Allgaier, P. Illes, G. Burnstock, and A. Reichenbach. 2000. P2X7 receptors in Muller glial cells from the human retina. *J Neurosci.* 20:5965-5972.
- Papp, L., E.S. Vizi, and B. Sperlagh. 2004. Lack of ATP-evoked GABA and glutamate release in the hippocampus of P2X7 receptor-/- mice. *Neuroreport.* 15:2387-2391.
- Parvathenani, L.K., S. Tertyshnikova, C.R. Greco, S.B. Roberts, B. Robertson, and R. Posmantur. 2003. P2X7 mediates superoxide production in primary microglia and is up-regulated in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Biol Chem.* 278:13309-13317.
- Pearse, D.D., F.C. Pereira, A.E. Marcillo, M.L. Bates, Y.A. Berrocal, M.T. Filbin, and M.B. Bunge. 2004. cAMP and Schwann cells promote axonal growth and functional recovery after spinal cord injury. *Nat Med.* 10:610-616.



- Peng, W., M.L. Cotrina, X. Han, H. Yu, L. Bekar, L. Blum, T. Takano, G.F. Tian, S.A. Goldman, and M. Nedergaard. 2009. Systemic administration of an antagonist of the ATP-sensitive receptor P2X7 improves recovery after spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:12489-12493.
- Perez-Alvarez, M.J., C. Maza Mdel, M. Anton, L. Ordonez, and F. Wandosell. 2012. Post-ischemic estradiol treatment reduced glial response and triggers distinct cortical and hippocampal signaling in a rat model of cerebral ischemia. *J Neuroinflammation*. 9:157.
- Perez, M.T., and A. Bruun. 1987. Colocalization of (3H)-adenosine accumulation and GABA immunoreactivity in the chicken and rabbit retinas. *Histochemistry*. 87:413-417.
- Pintor, J., J. Gualix, and M.T. Miras-Portugal. 1997. Diinosine polyphosphates, a group of dinucleotides with antagonistic effects on diadenosine polyphosphate receptor. *Mol Pharmacol*. 51:277-284.
- Poelchen, W., D. Sieler, K. Wirkner, and P. Illes. 2001. Co-transmitter function of ATP in central catecholaminergic neurons of the rat. *Neuroscience*. 102:593-602.
- Polleux, F., R.J. Giger, D.D. Ginty, A.L. Kolodkin, and A. Ghosh. 1998. Patterning of cortical efferent projections by semaphorin-neuropilin interactions. *Science*. 282:1904-1906.
- Potter, P., and T.D. White. 1980. Release of adenosine 5'-triphosphate from synaptosomes from different regions of rat brain. *Neuroscience*. 5:1351-1356.
- Price, G.D., S.J. Robertson, and F.A. Edwards. 2003. Long-term potentiation of glutamatergic synaptic transmission induced by activation of presynaptic P2Y receptors in the rat medial habenula nucleus. *Eur J Neurosci*. 17:844-850.
- Purkiss, J.R., and M.R. Boarder. 1992. Stimulation of phosphatidate synthesis in endothelial cells in response to P2-receptor activation. Evidence for phospholipase C and phospholipase D involvement, phosphatidate and diacylglycerol interconversion and the role of protein kinase C. *Biochem J*. 287 (Pt 1):31-36.
- Rakic, P. 2003. Developmental and evolutionary adaptations of cortical radial glia. *Cereb Cortex*. 13:541-549.
- Rampe, D., L. Wang, and G.E. Ringheim. 2004. P2X7 receptor modulation of beta-amyloid- and LPS-induced cytokine secretion from human macrophages and microglia. *J Neuroimmunol*. 147:56-61.
- Rasband, M.N. 2010. The axon initial segment and the maintenance of neuronal polarity. *Nat Rev Neurosci*. 11:552-562.
- Rathbone, M.P., P.J. Middlemiss, J.W. Gysbers, C. Andrew, M.A. Herman, J.K. Reed, R. Ciccarelli, P. Di Iorio, and F. Caciagli. 1999. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. *Prog Neurobiol*. 59:663-690.
- Ray, S.K., E.L. Hogan, and N.L. Banik. 2003. Calpain in the pathophysiology of spinal cord injury: neuroprotection with calpain inhibitors. *Brain Res Brain Res Rev*. 42:169-185.
- Resende, R.R., L.R. Britto, and H. Ulrich. 2008. Pharmacological properties of purinergic receptors and their effects on proliferation and induction of neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Int J Dev Neurosci*. 26:763-777.
- Resende, R.R., P. Majumder, K.N. Gomes, L.R. Britto, and H. Ulrich. 2007. P19 embryonal carcinoma cells as in vitro model for studying purinergic receptor expression and modulation of N-methyl-D-aspartate-glutamate and acetylcholine receptors during neuronal differentiation. *Neuroscience*. 146:1169-1181.
- Rettinger, J., A. Aschrafi, and G. Schmalzing. 2000. Roles of individual N-glycans for ATP potency and expression of the rat P2X1 receptor. *J Biol Chem*. 275:33542-33547.
- Rhee, J.S., Z.M. Wang, J. Nabekura, K. Inoue, and N. Akaike. 2000. ATP facilitates spontaneous glycinergic IPSC frequency at dissociated rat dorsal horn interneuron synapses. *J Physiol*. 524 Pt 2:471-483.
- Richardson, P.J., and S.J. Brown. 1987. ATP release from affinity-purified rat cholinergic nerve terminals. *J Neurochem*. 48:622-630.
- Richler, E., S. Chaumont, E. Shigetomi, A. Sagasti, and B.S. Khakh. 2008. Tracking transmitter-gated P2X cation channel activation in vitro and in vivo. *Nat Methods*. 5:87-93.

- Roberts, J.A., C. Vial, H.R. Digby, K.C. Agboh, H. Wen, A. Atterbury-Thomas, and R.J. Evans. 2006. Molecular properties of P2X receptors. *Pflügers Arch.* 452:486-500.
- Rodger, J., H. Goto, Q. Cui, P.B. Chen, and A.R. Harvey. 2005. cAMP regulates axon outgrowth and guidance during optic nerve regeneration in goldfish. *Mol Cell Neurosci.* 30:452-464.
- Rodrigues, R.J., T. Almeida, P.J. Richardson, C.R. Oliveira, and R.A. Cunha. 2005. Dual presynaptic control by ATP of glutamate release via facilitatory P2X1, P2X2/3, and P2X3 and inhibitory P2Y1, P2Y2, and/or P2Y4 receptors in the rat hippocampus. *J Neurosci.* 25:6286-6295.
- Rubio, M.E., and F. Soto. 2001. Distinct Localization of P2X receptors at excitatory postsynaptic specializations. *J Neurosci.* 21:641-653.
- Sanchez-Ponce, D., A. Munoz, and J.J. Garrido. 2011. Casein kinase 2 and microtubules control axon initial segment formation. *Mol Cell Neurosci.* 46:222-234.
- Sato, T., R. Sato-Harada, M. Takano, S. Kato, S. Saburi, and A. Harada. 2002. Localization of cAMP-dependent protein kinase in the actin and microtubule cytoskeletons in mouse hippocampal neurons. *Neurosci Lett.* 325:83-86.
- Sawada, K., N. Echigo, N. Juge, T. Miyaji, M. Otsuka, H. Omote, A. Yamamoto, and Y. Moriyama. 2008. Identification of a vesicular nucleotide transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:5683-5686.
- Scales, T.M., S. Lin, M. Kraus, R.G. Goold, and P.R. Gordon-Weeks. 2009. Nonprimed and DYRK1A-primed GSK3 beta-phosphorylation sites on MAP1B regulate microtubule dynamics in growing axons. *J Cell Sci.* 122:2424-2435.
- Scemes, E., S.O. Suadicani, G. Dahl, and D.C. Spray. 2007. Connexin and pannexin mediated cell-cell communication. *Neuron Glia Biol.* 3:199-208.
- Schaefer, A.W., N. Kabir, and P. Forscher. 2002. Filopodia and actin arcs guide the assembly and transport of two populations of microtubules with unique dynamic parameters in neuronal growth cones. *J Cell Biol.* 158:139-152.
- Schafer, D.P., S. Jha, F. Liu, T. Akella, L.D. McCullough, and M.N. Rasband. 2009. Disruption of the axon initial segment cytoskeleton is a new mechanism for neuronal injury. *J Neurosci.* 29:13242-13254.
- Scheid, M.P., and J.R. Woodgett. 2001. PKB/AKT: functional insights from genetic models. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:760-768.
- Schwamborn, J.C., M.R. Khazaei, and A.W. Puschel. 2007a. The interaction of mPar3 with the ubiquitin ligase Smurf2 is required for the establishment of neuronal polarity. *J Biol Chem.* 282:35259-35268.
- Schwamborn, J.C., M. Muller, A.H. Becker, and A.W. Puschel. 2007b. Ubiquitination of the GTPase Rap1B by the ubiquitin ligase Smurf2 is required for the establishment of neuronal polarity. *EMBO J.* 26:1410-1422.
- Schwamborn, J.C., and A.W. Puschel. 2004. The sequential activity of the GTPases Rap1B and Cdc42 determines neuronal polarity. *Nat Neurosci.* 7:923-929.
- Schwindt, T.T., C.A. Trujillo, P.D. Negraes, C. Lameu, and H. Ulrich. 2011. Directed differentiation of neural progenitors into neurons is accompanied by altered expression of P2X purinergic receptors. *J Mol Neurosci.* 44:141-146.
- Serafini, T., T.E. Kennedy, M.J. Galko, C. Mirzayan, T.M. Jessell, and M. Tessier-Lavigne. 1994. The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell.* 78:409-424.
- Shelly, M., L. Cancedda, S. Heilshorn, G. Sumbre, and M.M. Poo. 2007. LKB1/STRAD promotes axon initiation during neuronal polarization. *Cell.* 129:565-577.
- Shelly, M., L. Cancedda, B.K. Lim, A.T. Popescu, P.L. Cheng, H. Gao, and M.M. Poo. 2011. Semaphorin3A regulates neuronal polarization by suppressing axon formation and promoting dendrite growth. *Neuron.* 71:433-446.
- Shelly, M., B.K. Lim, L. Cancedda, S.C. Heilshorn, H. Gao, and M.M. Poo. 2010. Local and long-range reciprocal regulation of cAMP and cGMP in axon/dendrite formation. *Science.* 327:547-552.

- Shelly, M., and M.M. Poo. 2011. Role of LKB1-SAD/MARK pathway in neuronal polarization. *Dev Neurobiol.* 71:508-527.
- Shi, S.H., T. Cheng, L.Y. Jan, and Y.N. Jan. 2004. APC and GSK-3 $\beta$  are involved in mPar3 targeting to the nascent axon and establishment of neuronal polarity. *Curr Biol.* 14:2025-2032.
- Shi, S.H., L.Y. Jan, and Y.N. Jan. 2003. Hippocampal neuronal polarity specified by spatially localized mPar3/mPar6 and PI 3-kinase activity. *Cell.* 112:63-75.
- Shigetomi, E., and F. Kato. 2004. Action potential-independent release of glutamate by Ca<sup>2+</sup> entry through presynaptic P2X receptors elicits postsynaptic firing in the brainstem autonomic network. *J Neurosci.* 24:3125-3135.
- Silinsky, E.M., V. Gerzanich, and S.M. Vanner. 1992. ATP mediates excitatory synaptic transmission in mammalian neurones. *Br J Pharmacol.* 106:762-763.
- Skaper, S.D., L. Facci, A.A. Culbert, N.A. Evans, I. Chessell, J.B. Davis, and J.C. Richardson. 2006. P2X(7) receptors on microglial cells mediate injury to cortical neurons in vitro. *Glia.* 54:234-242.
- Smart, M.L., B. Gu, R.G. Panchal, J. Wiley, B. Cromer, D.A. Williams, and S. Petrou. 2003. P2X7 receptor cell surface expression and cytolytic pore formation are regulated by a distal C-terminal region. *J Biol Chem.* 278:8853-8860.
- Song, A.H., D. Wang, G. Chen, Y. Li, J. Luo, S. Duan, and M.M. Poo. 2009. A selective filter for cytoplasmic transport at the axon initial segment. *Cell.* 136:1148-1160.
- Sosa, L., S. Dupraz, L. Laurino, F. Bollati, M. Bisbal, A. Caceres, K.H. Pfenninger, and S. Quiroga. 2006. IGF-1 receptor is essential for the establishment of hippocampal neuronal polarity. *Nat Neurosci.* 9:993-995.
- Sperlagh, B., H. Sershen, A. Lajtha, and E.S. Vizi. 1998. Co-release of endogenous ATP and [3H]noradrenaline from rat hypothalamic slices: origin and modulation by  $\alpha$ 2-adrenoceptors. *Neuroscience.* 82:511-520.
- Sperlagh, B., G. Zsilla, M. Baranyi, P. Illes, and E.S. Vizi. 2007. Purinergic modulation of glutamate release under ischemic-like conditions in the hippocampus. *Neuroscience.* 149:99-111.
- Stojilkovic, S.S., M. Tomic, M.L. He, Z. Yan, T.A. Koshimizu, and H. Zemkova. 2005. Molecular dissection of purinergic P2X receptor channels. *Ann N Y Acad Sci.* 1048:116-130.
- Striedinger, K., P. Meda, and E. Scemes. 2007. Exocytosis of ATP from astrocyte progenitors modulates spontaneous Ca<sup>2+</sup> oscillations and cell migration. *Glia.* 55:652-662.
- Stuart, G., J. Schiller, and B. Sakmann. 1997. Action potential initiation and propagation in rat neocortical pyramidal neurons. *J Physiol.* 505 ( Pt 3):617-632.
- Surprenant, A., F. Rassendren, E. Kawashima, R.A. North, and G. Buell. 1996. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science.* 272:735-738.
- Tanaka, S., K. Ishii, K. Kasai, S.O. Yoon, and Y. Saeki. 2007. Neural expression of G protein-coupled receptors GPR3, GPR6, and GPR12 up-regulates cyclic AMP levels and promotes neurite outgrowth. *J Biol Chem.* 282:10506-10515.
- Tang, F., E.W. Dent, and K. Kalil. 2003. Spontaneous calcium transients in developing cortical neurons regulate axon outgrowth. *J Neurosci.* 23:927-936.
- Tapia, M., A. Del Puerto, A. Puime, D. Sanchez-Ponce, L. Fronzaroli-Molinieres, N. Pallas-Bazarra, E. Carlier, P. Giraud, D. Debanne, F. Wandosell, and J.J. Garrido. 2013. GSK3 and beta-catenin determines functional expression of sodium channels at the axon initial segment. *Cell Mol Life Sci.* 70:105-120.
- Tessier-Lavigne, M., and C.S. Goodman. 1996. The molecular biology of axon guidance. *Science.* 274:1123-1133.
- Thompson, R.J., N. Zhou, and B.A. MacVicar. 2006. Ischemia opens neuronal gap junction hemichannels. *Science.* 312:924-927.
- Tojima, T., J.H. Hines, J.R. Henley, and H. Kamiguchi. 2011. Second messengers and membrane trafficking

direct and organize growth cone steering. *Nat Rev Neurosci.* 12:191-203.

- Torres, G.E., T.M. Egan, and M.M. Voigt. 1999. Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners. *J Biol Chem.* 274:6653-6659.
- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76:4350-4354.
- Tsuda, M., Y. Shigemoto-Mogami, S. Koizumi, A. Mizokoshi, S. Kohsaka, M.W. Salter, and K. Inoue. 2003. P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature.* 424:778-783.
- Ulrich, H., M.P. Abbracchio, and G. Burnstock. 2012. Extrinsic purinergic regulation of neural stem/progenitor cells: implications for CNS development and repair. *Stem Cell Rev.* 8:755-767.
- Vacher, H., J.W. Yang, O. Cerda, A. Autillo-Touati, B. Dargent, and J.S. Trimmer. 2011. Cdk-mediated phosphorylation of the Kvbeta2 auxiliary subunit regulates Kv1 channel axonal targeting. *J Cell Biol.* 192:813-824.
- van Dijk, M., F.J. Muriana, P.C. van Der Hoeven, J. de Widt, D. Schaap, W.H. Moolenaar, and W.J. van Blitterswijk. 1997. Diacylglycerol generated by exogenous phospholipase C activates the mitogen-activated protein kinase pathway independent of Ras- and phorbol ester-sensitive protein kinase C: dependence on protein kinase C-zeta. *Biochem J.* 323 ( Pt 3):693-699.
- Verkhatsky, A. 2005. Physiology and pathophysiology of the calcium store in the endoplasmic reticulum of neurons. *Physiol Rev.* 85:201-279.
- Verkhatsky, A., and E.C. Toescu. 2006. Neuronal-glia networks as substrate for CNS integration. *J Cell Mol Med.* 10:826-836.
- Vial, C., J.A. Roberts, and R.J. Evans. 2004. Molecular properties of ATP-gated P2X receptor ion channels. *Trends Pharmacol Sci.* 25:487-493.
- Virginio, C., A. MacKenzie, R.A. North, and A. Surprenant. 1999. Kinetics of cell lysis, dye uptake and permeability changes in cells expressing the rat P2X7 receptor. *J Physiol.* 519 Pt 2:335-346.
- Vojtek, A.B., S.M. Hollenberg, and J.A. Cooper. 1993. Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell.* 74:205-214.
- von Kugelgen, I., H. Koch, and K. Starke. 1997. P2-receptor-mediated inhibition of serotonin release in the rat brain cortex. *Neuropharmacology.* 36:1221-1227.
- von Kugelgen, I., L. Spath, and K. Starke. 1994. Evidence for P2-purinoceptor-mediated inhibition of noradrenaline release in rat brain cortex. *Br J Pharmacol.* 113:815-822.
- von Reyn, C.R., J.M. Spaethling, M.N. Mesfin, M. Ma, R.W. Neumar, D.H. Smith, R. Siman, and D.F. Meaney. 2009. Calpain mediates proteolysis of the voltage-gated sodium channel alpha-subunit. *J Neurosci.* 29:10350-10356.
- Vosler, P.S., C.S. Brennan, and J. Chen. 2008. Calpain-mediated signaling mechanisms in neuronal injury and neurodegeneration. *Mol Neurobiol.* 38:78-100.
- Vulchanova, L., U. Arvidsson, M. Riedl, J. Wang, G. Buell, A. Surprenant, R.A. North, and R. Elde. 1996. Differential distribution of two ATP-gated channels (P2X receptors) determined by immunocytochemistry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:8063-8067.
- Waldo, G.L., and T.K. Harden. 2004. Agonist binding and Gq-stimulating activities of the purified human P2Y1 receptor. *Mol Pharmacol.* 65:426-436.
- Wang, C.M., Y.Y. Chang, J.S. Kuo, and S.H. Sun. 2002. Activation of P2X(7) receptors induced [(3)H]GABA release from the RBA-2 type-2 astrocyte cell line through a Cl(-)/HCO(3)(-)-dependent mechanism. *Glia.* 37:8-18.
- Wang, X., G. Arcuino, T. Takano, J. Lin, W.G. Peng, P. Wan, P. Li, Q. Xu, Q.S. Liu, S.A. Goldman, and M. Nedergaard. 2004. P2X7 receptor inhibition improves recovery after spinal cord injury. *Nat Med.* 10:821-827.
- Wang, Z.M., S. Katsurabayashi, J.S. Rhee, M. Brodwick, and N. Akaike. 2001. Substance P abolishes the facilitatory effect of ATP on spontaneous glycine release in neurons of the trigeminal nucleus pars

caudalis. *J Neurosci*. 21:2983-2991.

- Weissman, T.A., P.A. Riquelme, L. Ivic, A.C. Flint, and A.R. Kriegstein. 2004. Calcium waves propagate through radial glial cells and modulate proliferation in the developing neocortex. *Neuron*. 43:647-661.
- White, T.D. 1977. Direct detection of depolarisation-induced release of ATP from a synaptosomal preparation. *Nature*. 267:67-68.
- Wiencken-Barger, A.E., B. Djukic, K.B. Casper, and K.D. McCarthy. 2007. A role for Connexin43 during neurodevelopment. *Glia*. 55:675-686.
- Wiley, J.S., L.P. Dao-Ung, C. Li, A.N. Shemon, B.J. Gu, M.L. Smart, S.J. Fuller, J.A. Barden, S. Petrou, and R. Sluyter. 2003. An Ile-568 to Asn polymorphism prevents normal trafficking and function of the human P2X7 receptor. *J Biol Chem*. 278:17108-17113.
- Willoughby, D., and D.M. Cooper. 2007. Organization and Ca<sup>2+</sup> regulation of adenylyl cyclases in cAMP microdomains. *Physiol Rev*. 87:965-1010.
- Wirkner, K., A. Kofalvi, W. Fischer, A. Gunther, H. Franke, H. Groger-Arndt, W. Norenberg, E. Madarasz, E.S. Vizi, D. Schneider, B. Sperlagh, and P. Illes. 2005. Supersensitivity of P2X receptors in cerebrocortical cell cultures after in vitro ischemia. *J Neurochem*. 95:1421-1437.
- Witte, H., D. Neukirchen, and F. Bradke. 2008. Microtubule stabilization specifies initial neuronal polarization. *J Cell Biol*. 180:619-632.
- Woodgett, J.R. 1990. Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *EMBO J*. 9:2431-2438.
- Xiang, Z., M. Chen, J. Ping, P. Dunn, J. Lv, B. Jiao, and G. Burnstock. 2006. Microglial morphology and its transformation after challenge by extracellular ATP in vitro. *J Neurosci Res*. 83:91-101.
- Yan, D., L. Guo, and Y. Wang. 2006. Requirement of dendritic Akt degradation by the ubiquitin-proteasome system for neuronal polarity. *J Cell Biol*. 174:415-424.
- Yano, S., M. Tsukimoto, H. Harada, and S. Kojima. 2012. Involvement of P2Y13 receptor in suppression of neuronal differentiation. *Neurosci Lett*. 518:5-9.
- Yoshimura, T., N. Arimura, Y. Kawano, S. Kawabata, S. Wang, and K. Kaibuchi. 2006. Ras regulates neuronal polarity via the PI3-kinase/Akt/GSK-3beta/CRMP-2 pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 340:62-68.
- Yoshimura, T., Y. Kawano, N. Arimura, S. Kawabata, A. Kikuchi, and K. Kaibuchi. 2005. GSK-3beta regulates phosphorylation of CRMP-2 and neuronal polarity. *Cell*. 120:137-149.
- Yrjanheikki, J., J. Koistinaho, M. Kettunen, R.A. Kauppinen, K. Appel, M. Hull, and B.L. Fiebich. 2005. Long-term protective effect of atorvastatin in permanent focal cerebral ischemia. *Brain Res*. 1052:174-179.
- Yu, Y., S. Ugawa, T. Ueda, Y. Ishida, K. Inoue, A. Kyaw Nyunt, A. Umemura, M. Mase, K. Yamada, and S. Shimada. 2008. Cellular localization of P2X7 receptor mRNA in the rat brain. *Brain Res*. 1194:45-55.
- Zhang, F.L., L. Luo, E. Gustafson, K. Palmer, X. Qiao, X. Fan, S. Yang, T.M. Laz, M. Bayne, and F. Monsma, Jr. 2002. P2Y(13): identification and characterization of a novel G<sub>q</sub>-coupled ADP receptor from human and mouse. *J Pharmacol Exp Ther*. 301:705-713.
- Zhang, M., W. Li, G. Niu, R.K. Leak, J. Chen, and F. Zhang. 2013. ATP induces mild hypothermia in rats but has a strikingly detrimental impact on focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 33.
- Zhang, Z., G. Chen, W. Zhou, A. Song, T. Xu, Q. Luo, W. Wang, X.S. Gu, and S. Duan. 2007. Regulated ATP release from astrocytes through lysosome exocytosis. *Nat Cell Biol*. 9:945-953.
- Zhou, D., S. Lambert, P.L. Malen, S. Carpenter, L.M. Boland, and V. Bennett. 1998. AnkyrinG is required for clustering of voltage-gated Na channels at axon initial segments and for normal action potential firing. *J Cell Biol*. 143:1295-1304.
- Zhou, F.Q., and W.D. Snider. 2005. Cell biology. GSK-3beta and microtubule assembly in axons. *Science*. 308:211-214.

- Zhou, F.Q., J. Zhou, S. Dedhar, Y.H. Wu, and W.D. Snider. 2004. NGF-induced axon growth is mediated by localized inactivation of GSK-3 $\beta$  and functions of the microtubule plus end binding protein APC. *Neuron*. 42:897-912.
- Zimmermann, H. 2000. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 362:299-309.
- Zimmermann, H. 2006. Nucleotide signaling in nervous system development. *Pflugers Arch*. 452:573-588.
- Zimmermann, H., M. Zebisch, and N. Sträter. 2012. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal*. 8:437-502.
- Zylbersztejn, K., and T. Galli. 2011. Vesicular traffic in cell navigation. *FEBS J*. 278:4497-4505.

## ***Abreviaturas***

---





**2-MeSADP:** *2-Methyl-S-Adenosine DiPhosphate*

**ABC:** transportadores dependientes de hidrólisis de ATP

**AC5:** Adenilato Ciclasa 5

**ADN:** Ácido DesoxirriboNucleico

**ADP:** adenosín difosfato (*Adenosine DiPhosphate*)

**AKT:** homólogo del proto-oncogén del virus murino AKT8

**AMPc:** adenosín monofosfato cíclico (*cyclic Adenosine MonoPhosphate*)

**APC:** *Adenomatous Polyposis Coli gene product*

**APP:** proteína precursora amiloide (*Amyloid Precursor Protein*)

**AraC:** 1-β-D-arabinofuranosilcytosina

**ARN:** Ácido RiboNucleico

**ATP:** adenosín trifosfato (*Adenosine TriPhosphate*)

**BBG:** *Brilliant Blue G*

**BDNF:** Factor neurotróficos derivado de cerebro (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*)

**BSA:** Albúmina de suero bovino (*Bovine Serum Albumin*)

**BzATP:** *2',3'-O-(4-BenZoil-benzoil)Adenosin-5'-TriPhosphate*

**CAM-kinasa II:** *Calcium/calmodulin dependent protein kinase II*

**CCA:** arteria carótida común (*Common Carotid Artery*)

**Cdc42:** *Cell division cycle42*

**Cdk5:** Ciclina dependiente de kinasa 5

**CFP:** *Cyan Fluorescent Protein*

**CK2:** Caseína quinasa 2 (*Casein Kinase 2*)

**CRMP2:** *Collapsin-Response-Mediator Protein 2*

**C-terminal:** Carboxilo-terminal

**DAG:** DiAcil Glicerol

**DAPI:** 4'-6-Diamidino-2-fenilindol (*4'-6-Diamidino-2-phenylindole*)

**DIV:** Días In Vitro

**DMEM:** MEM modificado por Dubelco (*Dulbecco's modified Eagle's medium*)

**DNasa-I:** DesoxirriboNucleasa-I

**ECA:** arteria carótida externa (*External Carotid Artery*)

**EDTA:** Ácido Etilen-diamino-tetra-acético

**EGTA:** Ácido Etilen-glicol-tetra-acético

**E-NPPs:** ectonucleótido pirofosfatasa y/o fosfodiesterasa (*Ecto-Nucleotide Pirophosphatase and/or Phosphodiesterase*)

**E-NTPDasas:** ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasas (*Ecto-Nucleotide TriPhosphate Diphosphohidrolases*)

**F-actina:** filamentos de actina

**FBS:** Fetal Bovine Serum

**FRET:** Fluorescence Resonance Energy Transfer

**Fura-2AM:** Fura-2-AcetoxyMethyl ester

**GABA<sub>A</sub>:** ácido gamma-aminobutírico (γ-AminoButyric Acid)

**GAPDH:** Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GlycerAldehyde 3-Phosphate DeHydrogenase)

**GEF:** Guanine nucleotide Exchange Factors

**GFP:** Green Fluorescent Protein

**GluR:** Receptores de glutamato (Glutamate Receptors)

**GMPc:** Guanosín monofosfato cíclico (cyclic Guanosín MonoPhosphate)

**GPR3, GPR6 y GPR12:** Receptores “huérfanos” 3, 6, y 12 de receptores GPCR (G Protein Coupled Receptors)

**GSK3:** Glucógeno Sintasa Quinasa 3 (Glycogen Synthase Kinase 3)

**HBSS:** Hanks Buffer Salt Solution

**HEPES:** N-(2-hidroxietil)-piperacina-N'-(2-ácido etanolsulfónico) (N-(2-HydroxyEtil)-Piperazine-N'-(2-EthaneSulfonic acid)

**IC:** Inmunocitoquímica

**ICA:** arteria carótida interna (Internal Carotid Artery)

**IGF-I:** Factor de crecimiento insulínico tipo I (Insulin-like Growth Factor-I)

**ILK:** quinasa ligada a integrina (Integrin-Linked Kinase)

**KCC2:** Cotransportador de potasio/cloruro 2 (K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> Cotransporter 2)

**KDa:** kilo-Dalton

**KIF3:** *Kinesin superfamily protein 3*

**LKB1:** Liver kinase B1

**LTD:** Long Term Depression

**LTP:** Long Term Potentiation

**MAP:** Microtubule Associated Protein

**MAPK:** Microtubule Associated Protein Kinase

**MCAO:** Middle Cerebral Artery Oclusion

**MEM:** Minimum Essential Media

**mTor:** diana de mamíferos de la rapamicina (mammalian Target of Rapamycin)

**nAChR:** Receptor de acetilcolina (nicotinic AcetylCholine Receptor)

**NANC:** nervios inhibitorios No Adrenérgicos No Colinérgicos

**NB 27:** Medio Neurobasal suplementado con B27

**NF-186:** Neurofascina-186

**NgCAM:** Molécula de adhesión celular Neurona-glía (Neuron-glia Cell Adhesion Molecule)

**NGF:** Factor de crecimiento nervioso (Nerve Growth Factor)

**NMDA:** ácido N-metil-D-aspártico

**NO:** oxido nítrico

**NrCAM:** Molécula de adhesión neuronal (Neuronal Cell Adhesion Molecule)

**NT-3:** Neurotrofina-3

**N- terminal:** Amino-terminal

**oxo-ATP:** ATP oxidado con peryodato

**Par3, Par6:** partitioning defective 3 y 6

**PBS:** Solución Salina de Fosfato Tamponada (Phosphate-Buffered Saline)

**PDE4:** Inhibidor de fosfodiesterasa 4 (PhosphoDiEsterase inhibitor 4)

**PKD1:** Phosphoinositide-dependent kinase-1

**pEGFP-N1:** enhanced Green Fluorescent Protein

**PTX:** toxina pertúsica (Pertussis Toxin)

**PFA:** paraformaldehído

**PI3K:** Fosfoinosítido 3-quinasa (Phosphoinositide 3-Kinase)

**PIP3:** fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate)

**PKA:** Protein kinase A

**PKC/(ζPKC):** Protein kinase C/ atypical Protein kinase C

**PPADS:** pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid

**PSD-93/95:** Postsynaptic density Protein 93/95

**PTEN:** Homólogo de fosfatasa y tensinas (Phosphatase and Tensin homologue deleted on chromosome 10)

**Rac1:** Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1

**Rap1B:** Ras-related protein 1B

**RhoA:** Ras homolog gene family A

**rPMT:** recombinant Pasteurella Multocida Toxin

**RT-PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (ReaL Time- Polymerase Chain Reaction)

**SDS:** Dodecilsulfato sódico (Sodium dodecyl sulfate)

**shRNA:** small hairpin RNA

**SIA:** Segmento Inicial del Axón

**STRAD:** Ste20 Related Adaptor 20

**Tiam1:** T-cell lymphoma invasion and metastasis 1

**TM1 y TM2:** Dominios transmembrana 1 y 2

**TNAP:** fosfatasa alcalina no especifica de tejido (Tissue-nonspecific Alkaline Phosphatase)

**TrkR:** tropomyosin-receptor-kinase

**UTP:** Uridina-5'-trifosfato (Uridine-5'-triphosphate)

**YFP:** Yellow Fluorescent Protein

